



HAL
open science

Utilisation de nanoparticules magnétiques pour perturber la localisation spatiotemporelle de protéines de signalisation

Louise Bonnemay

► **To cite this version:**

Louise Bonnemay. Utilisation de nanoparticules magnétiques pour perturber la localisation spatiotemporelle de protéines de signalisation. Biophysique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066528 . tel-01133385

HAL Id: tel-01133385

<https://theses.hal.science/tel-01133385>

Submitted on 19 Mar 2015

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.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale 388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

Laboratoire PASTEUR, UMR8640

Utilisation de nanoparticules magnétiques pour perturber la localisation spatiotemporelle de protéines de signalisation

Par Louise Bonnemay

Thèse de doctorat

Dirigée par Zoher Gueroui

Soutenance le 19/12/2014

Devant un jury composé de :

Pr Ménager Christine, Examinatrice

Dr Wilhelm Claire, Rapportrice

Dr Théry Manuel, Rapporteur

Dr Delattre Marie, Examinatrice

Dr Gueroui Zoher, Directeur de thèse



Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à Zoher Gueroui pour m'avoir proposé ce sujet passionnant qui m'a permis de découvrir l'existence du cytosquelette. Je le remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir accompagnée durant ces trois années. Nos nombreuses discussions m'ont permis d'avancer et d'apprendre. Je le remercie également d'avoir toujours pris le temps de me conseiller sur ma carrière scientifique future.

Je remercie Ludovic Jullien, directeur du pôle à mon arrivée et Christophe Tribet qui a pris sa succession, pour m'avoir accueillie dans leur équipe.

Je tiens ensuite à remercier Manuel Théry et Claire Wilhelm rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Christine Ménager et Marie Delattre qui m'ont tous les quatre fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres du pôle Chimie Biophysique, passés ou présents, pour leurs conseils et commentaires, toujours constructifs. J'ai de plus beaucoup apprécié les repas, retraites de labo, et autres discussions que nous avons pu partager. La qualité scientifique et humaine du laboratoire tient à l'implication de ses membres permanents.

Je dois un grand merci à Anne et à Frédéric pour leur aide.
Un immense merci également à Isabelle pour sa présence au quotidien.

Je voudrais remercier les « jeunes scientifiques » que j'ai côtoyés durant ces trois années.

Tout d'abord, les différents post-docs qui se sont succédés au labo et qui ont grandement contribué à l'excellente ambiance qui y règne. Je profite de la tribune qui m'est offerte pour m'excuser auprès d'Ema pour mes goûts musicaux.

Ces 3 années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans les bières, les bons et les mauvais vins, les repas gastronomiques jurassiens, les karaokés et les barbus partagés avec les thésards du labo : les « historiques », Nicolas, Jérôme, Quentin (aussi appelé les « légumes ») et les « jeunes », Fabrice et Geoffrey. J'en profite pour souhaiter bon courage aux nouvelles recrues, Alexandra et Cheng, je suis sûre que l'ambiance restera aussi bonne.

Je remercie les stagiaires, tous plus sympathiques les uns que les autres, qui sont passés nous voir et plus particulièrement Charlène, avec qui j'ai travaillé sur l'actine.

Je remercie la vraie chef du labo, Marie-Aude, pour sa bonne humeur, son humour, ses conseils et les discussions du vendredi soir en attendant la fin de la manip.

Last but not least, la Gueroui's team : dans l'ordre d'apparition Docteur H, avec qui j'ai beaucoup appris, que ce soit sur les extraits, Top chef ou les taxos. Docteur G (d'ailleurs on attend toujours les merguez !), commandant de LA Team Rocket qui m'a appris tout ce que je sais (c'est dire !) sur les cellules. J'ai adoré travaillé avec vous deux. Rémite pour sa bonne humeur, ses blagues et ses indignations politiques et sociales. Alexandra, arrivée en stage et qui vient de signer pour 3 ans, pour nos discussions matinales, le café de bonhomme, et le féminisme. Marina Mercedes Garcia Jove Navajo de La Vega de Borbon y Borbon, para la buen humor, la piscina, y sobre todo las famosas « marinadas ». Sunischi, 私は私はあなたがフランスであなたを喜ばせるために継続を願って、私たちは昼食のために再び会うことにしよう、あなたを満たすために喜んでいました。

Je pars pas très loin, ne m'oubliez pas pour la prochaine visite à Mr. Bo.

Je voudrais ensuite remercier les relecteurs de mon manuscrit, Marie F, Quentin, Jeanne, Alice, Julie, « papamaman » et mes directeurs artistiques, Rémi, Alexandra et Marina qui ont supporté 3 mois de « elle est pas belle ma figure ?? ». Je les remercie également d'avoir relu ces remerciements.

Je ne pourrais pas finir sans une pensée pour ma famille et mes amis.

Table des matières

Chapitre 1 Introduction générale	5
1. Le cytosquelette	9
1.1. Microtubule.....	9
1.2. Le réseau d'actine.....	16
2. Établissement d'une asymétrie dans la distribution de protéines.	17
2.1. Organisation du cytosquelette et lien avec les cascades de signalisation : importance de la localisation des protéines	17
2.2. Hétérogénéité dans la distribution de protéines induite par diffusion ou transport actif.....	21
3. Méthodes permettant d'étudier les cascades de signalisation	29
4. Nanoparticules magnétiques	31
4.1. Utilisation des nanoparticules magnétiques en biologie	31
4.2. Activation magnétique de voie de signalisation	33
Organisation du manuscrit	39
Chapitre 2 Matériel et méthodes	41
1. Nanoparticules magnétiques	43
2. Expression et purification de protéines recombinantes	43
2.1. Transformation.....	43
2.2. Induction	44
2.3. Purification.....	44
3. Greffage de molécules sur les nanoparticules	45
3.1. Greffage du RanQ69L.....	45
3.2. Greffage du PEG-PLL fluorescent.....	45
3.3. Greffage de l'Epidermal Growth Factor	45
3.4. Greffage à la surface des nanoparticules de diamètre supérieur à 100 nm	45
3.5. Greffage a la surface des nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nm	46

4. Dispositif de microscopie	46
5. Extrait cellulaire de Xénope	46
5.1. Le <i>Xenopus laevis</i>	46
5.2. Préparation des extraits cellulaires de Xénope	47
5.3. Polymérisation des microtubules et assemblage des asters	49
5.4. Polymérisation et observation des filaments d'actine	50
5.5. Encapsulation des extraits	50
6. Gradient de nanoparticules magnétiques	51
6.1. Dispositif expérimental.....	51
6.2. Détermination de la concentration des nanoparticules au sein des gouttes	51
7. Etude de la localisation d'endosomes magnétique dans des cellules HeLa.....	53
7.1. Endocytose de nanoparticules magnétiques	54
7.2. Immunofluorescence : détection du récepteur EGFR.....	54
7.3. Pointe magnétique	54
7.4. Perturbation du cytosquelette.....	55
Chapitre 3 Contrôler un gradient de protéines de signalisation avec des nanoparticules magnétiques	57
1. Motivations.....	58
2. Gradient de nanoparticules magnétiques	60
2.1. Forces mises en jeu.....	60
2.2. Effet de la taille des nanoparticules et contrôle diffusionnel	61
2.3. Gradient de nanoparticules magnétiques	62
3. Gradient de protéines contrôlé par un champ magnétique	70
3.1. Assemblage d'un aster de microtubules.....	70
3.2. Couplage de RanGTP avec des nanoparticules magnétiques	71
3.3. Génération d'un gradient de RanGTP dans un environnement confiné	73
4. Discussion.....	77
4.1. Éléments en présence.....	77

4.2. Mécanisme 1 : délocalisation des asters induite par des forces de polymérisation ...	82
4.3. Hypothèse 2 : forces de traction due aux moteurs moléculaires.....	84
4.4. Conclusion.....	86
Chapitre 4 Localisation d'endosomes magnétiques.....	87
1. Introduction	88
2. Endocytose spécifique de l'Epidermal Growth Factor couplé aux nanoparticules magnétiques.	90
2.1. Internalisation et activation de l'EGFR par l'EGF	90
2.2. Internalisation de nanoparticules couplées à l'EGF	91
2.3. Dégradation de l'EGFR induite par l'internalisation des NP-EGF568.....	92
3. Manipulation magnétique intracellulaire	94
3.1. Internalisation et mouvement des nanoparticules sans champ magnétique	94
3.2. Application d'un gradient de champ en utilisant une pointe magnétique.....	96
3.3. Application aux transports magnétiques d'endosomes	100
4. Discussion et perspectives	110
4.1. Discussion sur la méthode de la pointe	110
4.2. Conclusion sur la technique de la pointe magnétique	112
4.3. Perspectives	112
Conclusion générale	115
Annexe : Anneau d'actine pour contrôler la nucléation des microtubules.....	117
1. Motivations.....	118
2. Caractérisation de l'anneau d'actine	119
2.1. Rayon de l'anneau : augmentation locale de la concentration	119
2.2. Transport induit par l'anneau d'actine	120
2.3. Perturbation de la formation de l'anneau	121
3. Formation d'asters induite par RanQ69L.....	122
3.1. Assemblage des asters.....	122

3.2. Conservation des propriétés de signalisation de RanQ69L en extrait non encapsulé dans des gouttes.....	124
4. Nucléation des microtubules induite par la contraction de l'actine	125
Bibliographie.....	128
Publications.....	141

Chapitre 1 Introduction générale

1. Le cytosquelette	9
1.1. Microtubule.....	9
1.1.1. Structure et dynamique	9
1.1.2. Moteurs moléculaires	11
1.1.3. Forces s'appliquant sur les microtubules	12
1.1.3.1. Forces dues à la dynamique des microtubules.....	12
1.1.3.1.1. Forces dues à la polymérisation des microtubules	12
1.1.3.1.2. Forces dues à la dépolymérisation des microtubules	15
1.1.3.2. Forces dues à l'action des moteurs moléculaires.....	15
1.1.3.3. Rôle des forces sur le positionnement de l'appareil de division cellulaire	15
1.2. Le réseau d'actine.....	16
1.2.1. Structure et dynamique	16
1.2.2. Myosine II	17
2. Établissement d'une asymétrie dans la distribution de protéines.	17
2.1. Organisation du cytosquelette et lien avec les cascades de signalisation : importance de la localisation des protéines	17
2.1.1. Chimio-taxie	17
2.1.2. Embryo de <i>Caenorhabditis elegans</i>	18
2.1.3. Développement précoce de l'embryon de drosophile : gradient de morphogène	20
2.1.4. Polarisation de structures d'actine	20
2.2. Hétérogénéité dans la distribution de protéines induite par diffusion ou transport actif	21
2.2.1. Établissement d'un gradient intracellulaire de protéines.....	22
2.2.1.1. Étude théorique d'un gradient de protéines de signalisation	22
2.2.1.2. Exemple du gradient de RanGTP	24
2.2.2. Trafic intracellulaire et endocytose : rôle de la localisation spatiotemporelle.....	26
3. Méthodes permettant d'étudier les cascades de signalisation	29
4. Nanoparticules magnétiques	31
4.1. Utilisation des nanoparticules magnétiques en biologie	31
4.1.1. Imagerie par résonance magnétique.....	31
4.1.2. Séparation.....	32
4.1.3. Thérapie	32
4.1.4. Mesures physiques	32
4.1.5. Ingénierie tissulaire.....	33
4.2. Activation magnétique de voie de signalisation	33

Introduction générale

4.2.1.	Activation magnétique de récepteurs en surface des cellules	33
4.2.2.	Contrôle magnétique d'une cascade de signalisation intracellulaire	35

Introduction générale

Une cellule est un objet complexe qui ne peut pas être réduit à un simple « sac » de molécules réparties de façon homogène. Elle peut être vue au contraire comme un espace compartimenté, avec un cytosquelette (microfilaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires) qui contribue à l'agencement intracellulaire, des organelles (noyau, appareil de Golgi ...), et enfin le cytosol, dans lequel sont diluées des macromolécules (ARN, protéines,...) (Figure 1).

Du fait de la compartimentation de l'espace intracellulaire, la distribution de molécules est hétérogène dans la cellule. Des réactions chimiques localisées, et le transport de molécules (par diffusion ou par transport actif le long des microtubules), entretiennent cette hétérogénéité.

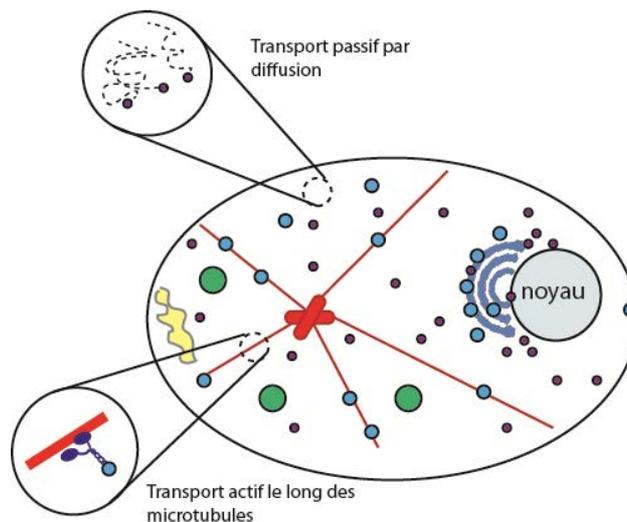


Figure 1 Schéma représentant l'encombrement cellulaire. Du fait de la membrane cellulaire, des organelles, du cytosquelette et du transport intracellulaire, une cellule est un espace compartimenté. Cette compartimentation conduit à des inhomogénéités dans la distribution intracellulaire des molécules. Schéma inspiré du site de Jorg Langowski.

<http://www.dkfz.de/Macromol/research/imagingdiffusionprocesses.html>

Cette hétérogénéité dans la répartition de protéines entretenue par le cytosquelette est bien illustrée dans le cas des cellules épithéliales. Ces cellules sont fortement polarisées, avec un pôle apical, tourné vers l'extérieur et un pôle basal. Cette polarité définit donc deux régions, avec des différences dans la structure du cytosquelette ou la distribution de protéines (Figure 2).

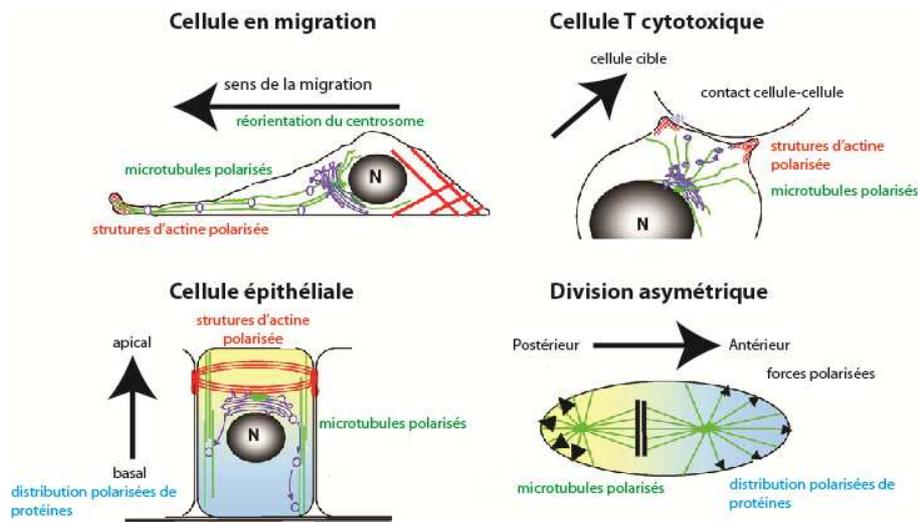


Figure 2 Exemple de cellules polarisées. Modifié à partir de [2].

La polarité des cellules épithéliales vient d'une répartition différentielle des protéines. Par exemple les protéines PKC sont recrutées au niveau du cortex apical, alors que les protéines PAR se trouvent au niveau du cortex basal. La présence des protéines PKC à un endroit de la cellule exclut celle des protéines PAR, et inversement¹. La localisation de ces protéines a une influence sur l'organisation du cytosquelette, qui lui-même rétroagit sur la distribution de protéines. D'autres exemples de cellules polarisées sont visibles sur la figure 2. Ces cellules ont des morphologies très différentes, cependant elles se polarisent souvent à l'aide de mécanismes similaires à celui expliqué pour les cellules épithéliales, c'est-à-dire *via* l'activité localisée de protéines de signalisation². La localisation interne des protéines est donc très importante pour un grand nombre de fonctions cellulaires comme la migration ou la division.

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à étudier l'effet d'une distribution hétérogène de protéines sur l'organisation cellulaire, en utilisant essentiellement des nanoparticules magnétiques. Pour introduire ce travail, nous allons tout d'abord rappeler quelques notions de l'organisation spatiale des cellules. Nous nous intéresserons ensuite aux brisures de symétries pouvant apparaître dans une cellule et à l'établissement d'une concentration hétérogène de protéines en résultant. Enfin, nous présenterons quelques méthodes utilisées pour étudier ces asymétries en nous arrêtant plus particulièrement sur l'usage des nanoparticules magnétiques dans ce domaine.

1. Le cytosquelette

Le cytosquelette est constitué de trois types de polymères : les microtubules, les microfilaments d'actine, et les filaments intermédiaires (Figure 3). Ils permettent le soutien mécanique de la cellule, et ils sont également à la base de plusieurs fonctions cellulaires telles que la division, la migration, ou encore la communication extra et intra cellulaire. Ils interagissent constamment avec d'autres éléments cellulaires (protéines, moteurs moléculaires, cortex cellulaire...) et sont extrêmement dynamiques grâce à une polymérisation/dépolymérisation permanente.

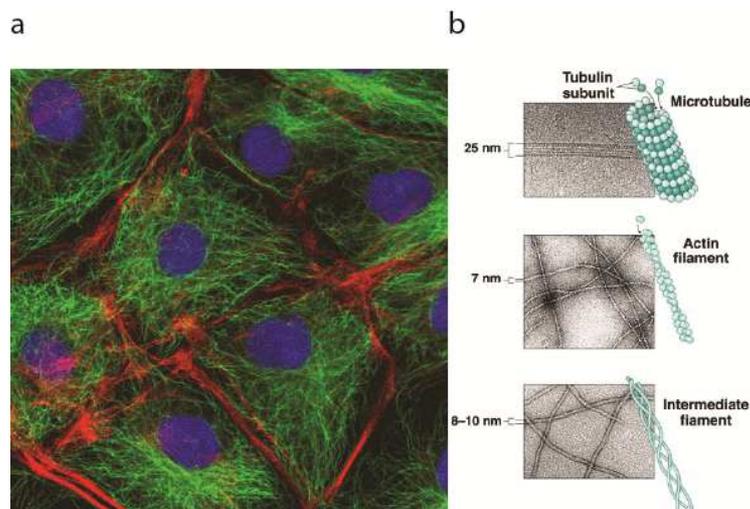


Figure 3 Eléments du cytosquelette. a, Observation par microscopie de fluorescence du cytosquelette de cellules eucaryotes. Vert : microtubules, rouge : filaments d'actine, bleu : noyau. Tiré du site de la British Society for Cell Biology. www.bscb.org. b, Images de microscopie électronique et représentations schématiques des différents types de filaments³. Tiré de [3].

Dans cette section, nous allons nous intéresser aux propriétés structurales et dynamiques de l'actine et des microtubules.

1.1. Microtubule

1.1.1. Structure et dynamique

Les microtubules sont des tubes faits de 13 protofilaments. Ces protofilaments ont un diamètre interne de 14 nm et un diamètre externe de 25 nm. Ils s'assemblent à partir des dimères de tubuline (alternance de α -tubuline et de β -tubuline) (Figure 4).

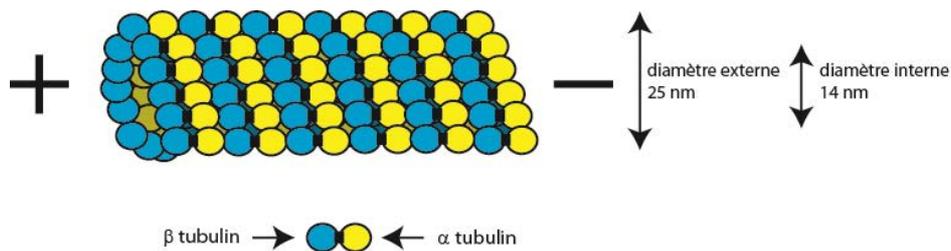


Figure 4 Structure d'un filament de microtubule

À cause de l'asymétrie des dimères (α -tubuline, β -tubuline), les microtubules sont des filaments polaires. En effet, les monomères α et β portent tous les deux une molécule de GTP, cependant, la stabilité de cette molécule de GTP est différente pour les deux monomères. La molécule de GTP liée à la tubuline α est stable, alors que celle liée à la tubuline β peut être hydrolysée en GDP après polymérisation des dimères. Cela entraîne une différence dans le comportement dynamique des deux extrémités, qui est la base d'un modèle de polymérisation des microtubules, appelé modèle de la « coiffe de GTP ». L'extrémité β , appelée extrémité « + » va croître plus rapidement que l'extrémité α , appelée extrémité « - ». La polymérisation a donc lieu essentiellement à l'extrémité « + » (Figure 5).

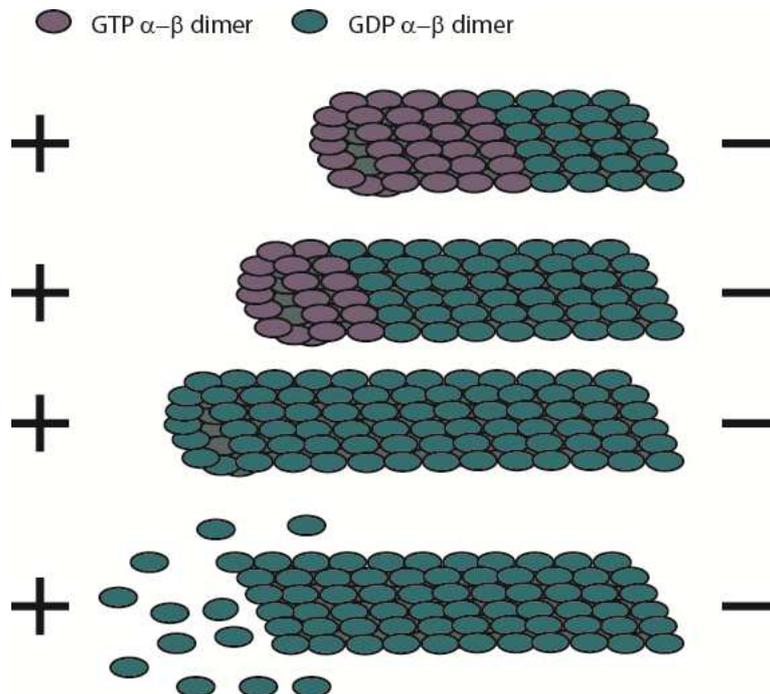


Figure 5 Mécanisme de catastrophe à l'extrémité « + » d'un microtubule. Les dimères se lient au filament à l'état actif GTP. Le GTP peut ensuite s'hydrolyser en GDP qui va déstabiliser le filament. L'ajout d'un nouveau dimère dans l'état GTP va protéger le filament de la dépolymérisation sauf si l'hydrolyse est plus rapide que l'ajout de dimères. On a alors dépolymérisation rapide et catastrophe.

Les microtubules subissent fréquemment des dépolymérisations soudaines appelées « catastrophes » : la tubuline liée au GDP est moins stable que celle liée au GTP. À l'extrémité « + », si la polymérisation est plus lente que l'hydrolyse, les microtubules dépolymérisent de manière rapide (Figure 5). Une molécule de GTP peut alors se lier à l'extrémité « + » et protéger le microtubule jusqu'à la prochaine catastrophe. Ce phénomène est appelé « sauvetage »^{4,5}.

Ce modèle classique a été complété en 2008 par l'équipe de Frank Pérez⁶. Ils ont observé, grâce à un anticorps reconnaissant la tubuline liée au GTP, que celle-ci n'est pas présente uniquement à l'extrémité « + » du polymère mais également à l'intérieur, sous forme « d'îlots » dans des zones polymérisées antérieurement. Ils ont ainsi proposé un nouveau modèle pour la dynamique des microtubules : quand le GTP à l'extrémité des microtubules s'hydrolyse, une catastrophe intervient, et donc une dépolymérisation jusqu'à atteindre l'îlot de GTP, où la polymérisation peut reprendre (Figure 6). Ce modèle pourrait expliquer la fréquence élevée de sauvetages des microtubules.

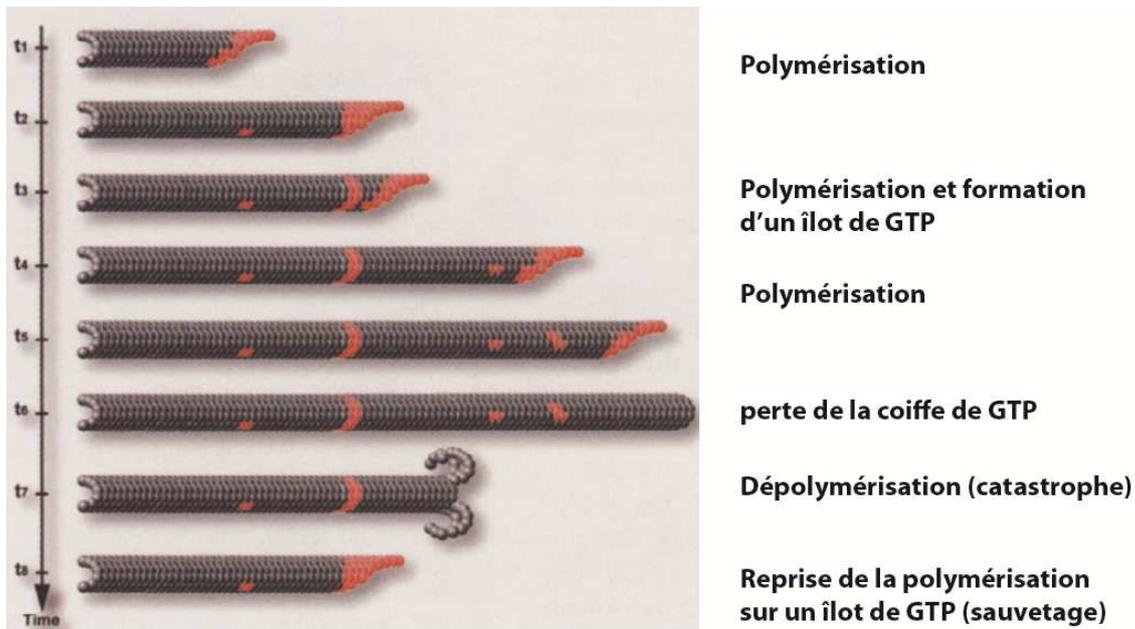


Figure 6 Cycle de vie d'un microtubule : modèles des îlots de GTP. Modifié à partir de [6] et du site du CNRS.

Les propriétés mécaniques des microtubules sont importantes pour leur fonction. Ils peuvent être considérés comme des polymères semi-flexibles. Leur longueur de persistance est estimée à 6 mm *in vitro*⁷. À l'échelle d'une cellule les microtubules peuvent donc être considérés comme rigides.

1.1.2. Moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires sont des protéines qui se lient aux filaments du cytosquelette et se déplacent le long de ces filaments en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. La plupart des

moteurs sont constitués d'un domaine moteur qui s'accroche aux filaments et hydrolyse l'ATP et d'une queue qui transporte les cargos. Deux types de moteurs se lient aux microtubules : les kinésines et les dynéines. Les kinésines se déplacent vers l'extrémité « + » des microtubules, alors que les dynéines se déplacent vers l'extrémité « - ». Les moteurs moléculaires sont notamment impliqués dans le transport intracellulaire : ils transportent des cargos le long des microtubules. Ce mécanisme permet un déplacement rapide et localisé des molécules dans les cellules⁸. Les dynéines interviennent également dans l'auto-organisation des microtubules, notamment lors de l'assemblage des fuseaux mitotiques et méiotiques. Les dynéines sont ainsi capables d'organiser spontanément les microtubules en structures radiales appelées asters^{9, 10} aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Figure 7).

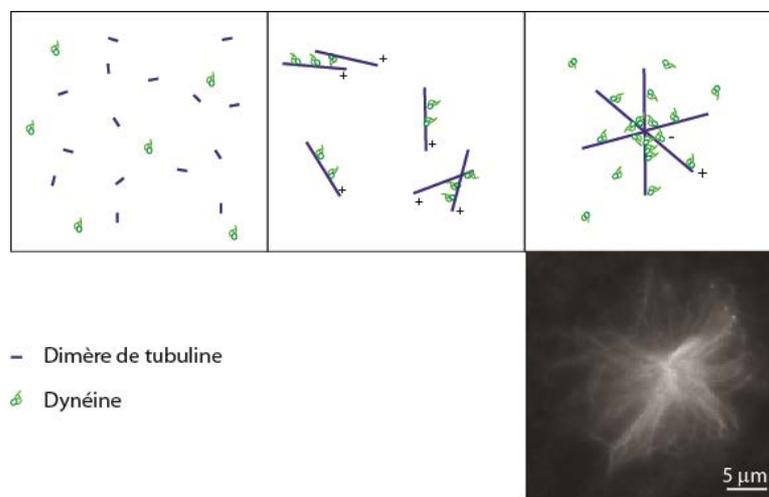


Figure 7 Les microtubules peuvent s'organiser en asters grâce aux dynéines. Schéma expliquant ce mécanisme. Photo d'un aster de microtubules formé en extrait cellulaire de Xénope. Les microtubules sont visualisés avec de la tubuline fluorescente.

1.1.3. Forces s'appliquant sur les microtubules

Des forces, dues à la dynamique des microtubules (polymérisation/dépolymérisation) ou aux moteurs moléculaires s'exercent sur les microtubules.

1.1.3.1. Forces dues à la dynamique des microtubules

1.1.3.1.1. Forces dues à la polymérisation des microtubules

La polymérisation des microtubules, quand elle est localisée près d'une membrane, peut générer une force suffisante pour déplacer la fibre ou induire une déformation de la membrane. Ainsi Dogterom et *al.* ont mesuré la force induite par la polymérisation des microtubules contre une membrane rigide^{11, 12}. Un microtubule est accroché à l'extrémité d'un canal (dans le sens de la

largeur) et il croît à partir de cette extrémité. Quand il atteint l'autre extrémité du canal, sa croissance ne s'arrête pas, mais ralentit et le microtubule se courbe (Figure 8).

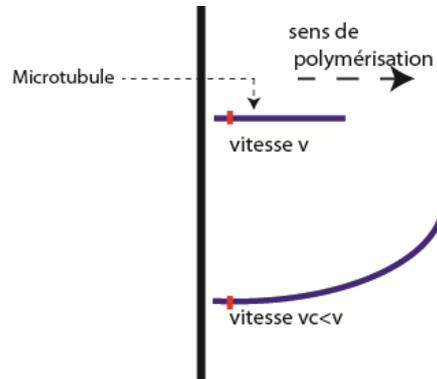


Figure 8 Les microtubules sont accrochés à une extrémité du canal, et polymérisent en direction de l'autre extrémité. Quand ils arrivent au contact de l'autre extrémité du canal, la vitesse de polymérisation diminue et les microtubules se courbent.

Cela signifie que la croissance du microtubule peut générer une force suffisante pour passer au-dessus de l'énergie de courbure de la fibre. En analysant la courbe prise par les microtubules polymérisant contre la paroi et connaissant leur rigidité ($34 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^2$ dans leur cas), les auteurs ont pu obtenir la force exercée et surtout la relation entre la force et la vitesse de croissance. Ils ont trouvé que cette force était de l'ordre de 5 pN au maximum.

Fygenson *et al.* ont eux mesuré la force de polymérisation contre une paroi flexible¹³. Ils ont fait croître de manière contrôlée des microtubules dans des vésicules. Quand les microtubules atteignent le bord de la vésicule, la polymérisation crée une force suffisante pour déformer la membrane (Figure 9). Ils ont trouvé que cette force était supérieure à 2 pN.

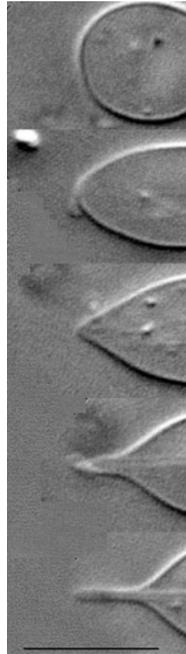


Figure 9 Plusieurs microtubules polymérisent dans une vésicule. La polymérisation crée une force suffisante pour déformer la membrane. Tiré de [13]

Un mécanisme possible pour cette génération de forces est le « Brownian ratchet » (ou « cliquet thermique »), qui a été utilisé pour expliquer la force générée par des polymères polymérisant contre une paroi¹⁴. Dans ce modèle, les fluctuations browniennes de l'extrémité d'un microtubule polymérisant contre une paroi sont considérées comme suffisantes pour créer un espace permettant d'incorporer un dimère de tubuline (Figure 10).

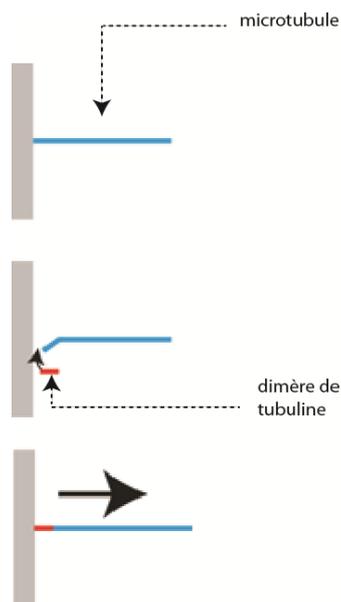


Figure 10 Modèle du « brownian ratchet »

La croissance du microtubule est décrite par deux paramètres, k_{on} , le taux d'ajout d'un dimère de tubuline et k_{off} , le taux de désassemblage d'un dimère. Comme $k_{off} \ll k_{on}$, l'effet de la croissance contre une paroi sur k_{off} est négligé. Si le filament se trouve à une distance inférieure à la taille d'un dimère (8 nm) de la paroi, il est impossible d'ajouter un dimère. Pour ajouter un dimère, les fluctuations thermiques doivent courber suffisamment le filament pour créer un espace supérieur ou égal à δ entre la paroi et le filament. Si les fluctuations thermiques sont plus rapides que l'ajout d'un dimère alors le taux d'ajout d'un dimère devient :

$$p(f,y) = k_{on} e^{\frac{f \cdot (y-\delta)}{k_B T}}, \text{ où } f \text{ est la force nécessaire à l'ajout d'un dimère.}$$

Avec ce modèle, on trouve une relation vitesse/force : $V(f) = (y - \delta) [k_{on} e^{\frac{f \cdot (y-\delta)}{k_B T}}] \cdot c - k_{off}$, où c est la concentration des dimères. Ce modèle donne le bon ordre de grandeur pour la force de polymérisation mais surestime les résultats expérimentaux^{11, 15}. Mogilner et *al.* ont généralisé ce modèle en prenant en compte maintenant le fait que les microtubules sont formés de 13 protofilaments qui, dans leur modèle, polymérisent et dépolymérisent indépendamment dans la même direction. Avec ce modèle ils ont trouvé une bonne concordance avec les résultats expérimentaux¹⁵.

Des mesures de forces ont aussi été effectuées en accrochant une bille au microtubule et en mesurant la force sur un microtubule ne se courbant pas grâce à une pince optique^{16, 17}. Cette méthode donne des forces du même ordre de grandeur (pN) et permet des mesures sur des microtubules de longueur plus courte.

1.1.3.1.2. Forces dues à la dépolymérisation des microtubules

La dépolymérisation des microtubules peut également générer des forces¹⁸. Ces forces ont été mesurées *in vitro* avec des pinces optiques¹⁹. Grishchuk et *al.* ont trouvé des forces de l'ordre du pN.

1.1.3.2. Forces dues à l'action des moteurs moléculaires

Des forces de tractions peuvent aussi s'exercer sur les microtubules. Les moteurs moléculaires sont capables de transporter des objets sur plusieurs micromètres. Quand elle est fixée sur un substrat, la dynéine permet de déplacer les microtubules en hydrolysant l'ATP, de l'extrémité « + » vers l'extrémité « - », tandis que la kinésine les déplace en sens inverse²⁰. Des mesures réalisées avec des pinces optiques ont montré que les dynéines et les kinesines exerçaient des forces de l'ordre du pN (entre 1 et 5 pN, suivant les études)²¹⁻²⁴.

1.1.3.3. Rôle des forces sur le positionnement de l'appareil de division cellulaire

Dans les cellules eucaryotes le fuseau mitotique peut être situé soit au milieu de la cellule, soit excentré²⁵⁻²⁷. Ce positionnement peut s'expliquer par la capacité des microtubules à pousser ou tirer (grâce aux dynéines) sur le cortex cellulaire (mécanisme de pushing-pulling)²⁸.

Dans les systèmes de petites tailles comme les levures c'est le mécanisme de poussé qui est le plus mis en jeu pour positionner le fuseau. En revanche, pour des organismes de tailles plus

importantes comme les embryons de *Caenorhabditis elegans*, les microtubules doivent être très longs pour atteindre le cortex cellulaire. Ils peuvent alors flamber et rendre ce mécanisme de poussée inefficace. La traction sur le cortex ou sur des organelles du cytoplasme est donc utilisée dans ce cas^{12, 29, 30}.

Le mécanisme de « pushing-pulling » permet également un positionnement asymétrique du fuseau, car les générateurs de forces (dynéines ou microtubules) peuvent être distribués de manière asymétrique sur le cortex cellulaire ou dans le cytoplasme^{12, 31, 32}.

Il a été montré *in vitro* dans des systèmes confinés (chambres microfabriquées ou gouttes) que les forces de poussées pouvaient aussi permettre aux asters de trouver le centre d'un espace confiné³³⁻³⁵.

1.2. Le réseau d'actine

1.2.1. Structure et dynamique

Un filament d'actine, appelé actine F, est une hélice formée de monomères d'actine (appelés actine G).

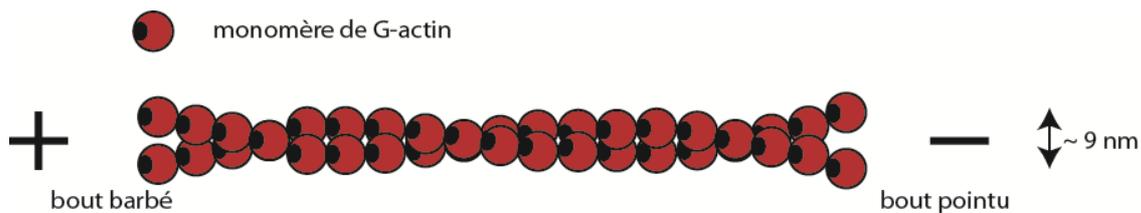


Figure 11 Structure d'un filament d'actine.

Comme les microtubules, les filaments d'actine sont polaires, avec une extrémité « + », appelée bout « barbé », qui croît plus vite, et une extrémité « - », appelée bout « pointu » (Figure 11). Cette polarité vient d'une asymétrie du monomère par rapport à un site de liaison de l'ATP qui, en s'hydrolysant, va réguler la polymérisation des filaments⁵ (Figure 12).

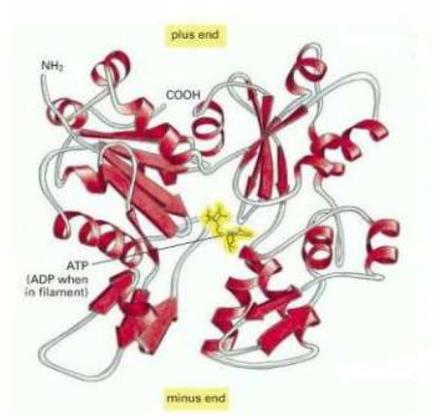


Figure 12 Structure de l'actine G. Tiré de [5].

Les filaments d'actine sont des polymères dynamiques. Les monomères d'actine sont ajoutés au filament à l'extrémité barbée (+), dans la forme ATP et sont ensuite hydrolysés en ADP. Ils progressent dans le filament et sont détachés sous forme ADP à l'extrémité pointue (-). Ce mécanisme de polymérisation / dépolymérisation est appelé « tapis roulant » (Figure 13).

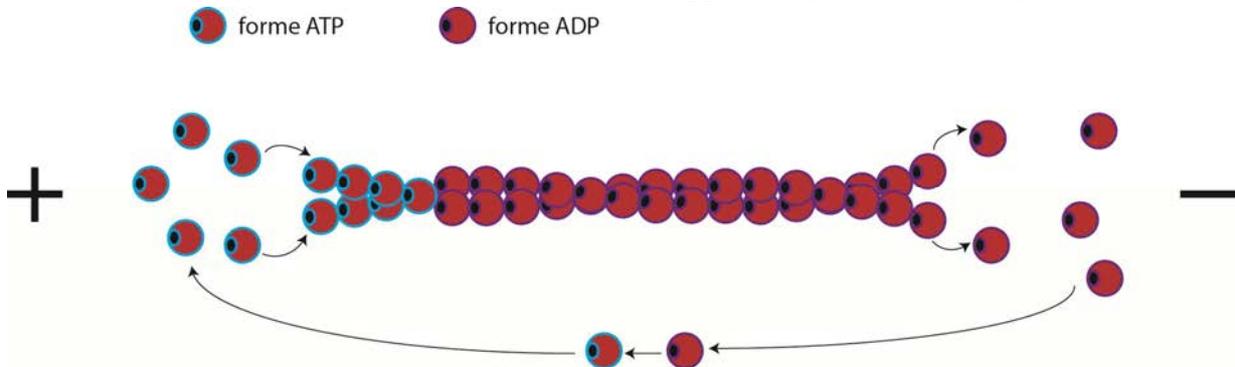


Figure 13 Dynamique de polymérisation d'un filament d'actine.

Les filaments d'actine ont une longueur de persistance de 15 μm , ils sont donc beaucoup plus flexibles que les microtubules.

1.2.2. Myosine II

Comme la dynéine et la kinésine, la myosine II utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des filaments d'actine. Elle se déplace de l'extrémité pointue à l'extrémité barbée. Dans sa forme oligomérisée, la myosine est responsable des fibres de stress dans les muscles, par glissement de filaments dans des directions opposées.

Les microfilaments d'actine et les microtubules, de par leur caractère polaire, sont à la base de nombreuses fonctions qui nécessitent une polarisation cellulaire. Ils sont ainsi impliqués, entre autre, dans la division cellulaire, la migration, la communication intra et extracellulaire...

Nous allons maintenant voir comment une brisure de symétrie peut apparaître dans une cellule et nous nous intéresserons plus particulièrement aux liens existant pour cela entre le cytosquelette et des protéines de signalisation.

2. Établissement d'une asymétrie dans la distribution de protéines.

2.1. Organisation du cytosquelette et lien avec les cascades de signalisation : importance de la localisation des protéines

2.1.1. Chimio-taxie

La chimio-taxie est le phénomène par lequel un organisme se déplace en fonction de la concentration de molécules présentes dans son environnement. Ce mécanisme a été très bien décrit pour les bactéries. Les bactéries sont capables de ressentir et de répondre à une différence de concentration en nutriments de l'ordre de quelques nM^{36} . Ce phénomène a également été

observé pour des cellules eucaryotes. Les leucocytes, par exemple, détectent un gradient de molécules chemoattractantes et réagissent par l'activation localisée d'une cascade de protéines qui va conduire *in fine* à un assemblage local de filaments d'actine et à une migration dans la direction du gradient.³⁷ (Figure 14).

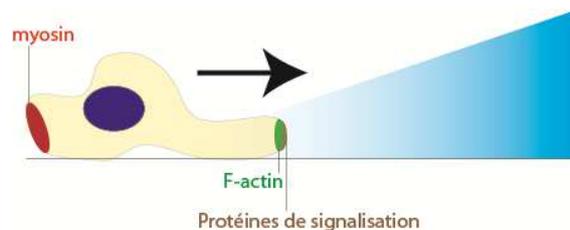


Figure 14 Les cellules sont capables de ressentir un environnement extérieur asymétrique et d'y réagir par une polymérisation locale de filaments d'actine.

La réorganisation du cytosquelette vient ici d'un signal extérieur à la cellule, qui déclenche une voie de signalisation et agit sur la structure.

2.1.2. Embryon de *Caenorhabditis elegans*

Un autre exemple de signal externe localisé conduisant à une asymétrie cellulaire est la division de l'embryon de *C. elegans*. Le point d'entrée du spermatozoïde va déterminer un axe de polarité et par conséquent un pôle postérieur et un pôle antérieur^{38, 39}. Les pôles postérieurs et antérieurs sont définis par une répartition différente des protéines PAR sur le cortex. Les protéines PAR-1 et PAR-2 se trouvent au pôle postérieur (proche du point d'entrée du spermatozoïde). Au pôle antérieur se trouvent les protéines PCK-3, PAR-3, et PAR-6 (Figure 15). Les protéines PAR-1 et PAR-2 sont à l'origine des forces produites par les dynéines corticales qui vont tirer les microtubules et rapprocher le fuseau du pôle postérieur. Cela va aboutir à la formation de deux cellules filles de tailles différentes.

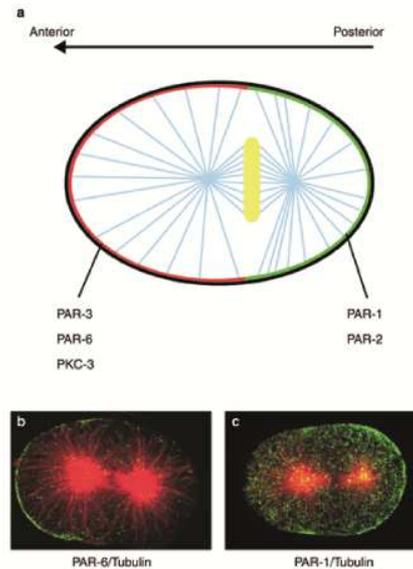


Figure 15 a, Schéma représentant la répartition des protéines pendant la division asymétrique du *C. elegans*. b, c, Séparation spatiale des protéines PAR-6 et PAR-1 aux pôles de l'embryon. Positionnement asymétrique du fuseau mitotique. Tiré de [39]

Le mécanisme par lequel les protéines PAR se retrouvent localisées différemment aux deux extrémités de la cellule n'est pas encore complètement connu. L'interaction entre les microtubules et le cortex cellulaire entre en jeu *via* le MTOC (MicroTubule Organizing Center) porté par le spermatozoïde. Le réseau d'actomyosine semble jouer également un rôle. En effet, le spermatozoïde déstabilise initialement le réseau d'actomyosine près de son point d'entrée (futur pôle postérieur). Cette asymétrie crée un flux d'actine et de myosine en direction du pôle opposé (futur pôle antérieur). Les protéines PAR-3, PCK-3 et PAR-6 sont transportées par ce flux. Les protéines PAR-2 et PAR-5, elles, inhibent la myosine. Elles restent donc localisées au pôle postérieur et maintiennent et augmentent l'asymétrie initiale en empêchant toute accumulation des autres protéines^{40, 41} (figure 16).

On a donc un mécanisme de rétroaction entre des protéines et le cytosquelette.

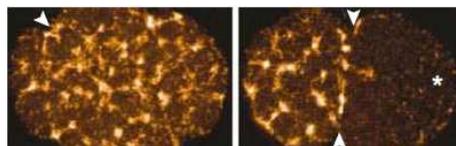


Figure 16 Brisure de symétrie dans un embryon de *C. elegans*. Réseau cortical de myosine II avant (gauche) et après (droite) la fertilisation. L'astérisque montre le point d'entrée du spermatozoïde. Tiré de [40].

2.1.3. Développement précoce de l'embryon de drosophile : gradient de morphogène

Un des mécanismes clés de la segmentation durant le développement précoce de la drosophile est lié à l'établissement de gradients de morphogène. Le gradient de Bicoid en est un exemple. Un ARN messager de Bicoid est attaché à la membrane sur la partie antérieure de l'embryon. La traduction de cet ARNm crée un gradient de Bicoid. Bicoid est un facteur de transcription, il régule donc l'expression d'autres gènes, notamment celle du gène Hunchback. On peut voir sur la figure 17,a le gradient de Bicoid et la distribution asymétrique de la protéine Hunchback qui résulte de la transcription localisée du gène Hunchback. Finalement le gradient de Bicoid et les différentes transcriptions de protéines localisées spatialement qui en découlent vont aboutir à une première régionalisation de l'embryon (Figure 17,b).

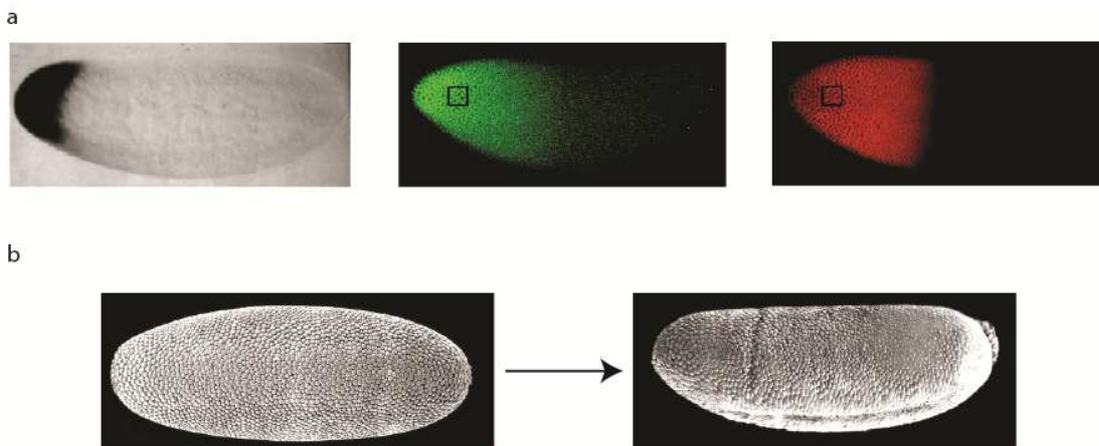


Figure 17 Dans les premiers cycles du développement de l'embryon de drosophile des motifs d'expression de protéines apparaissent, en particulier pour le Bicoid. Ces motifs conduisent à une régionalisation de l'embryon. a, Gauche : ARNm du Bicoid. Milieu : gradient de Bicoid. Droite : distribution asymétrique de la protéine Hunchback induite par le gradient de Bicoid. b, Première régionalisation de l'embryon. Le sillón indique la position de la future tête. Tiré du site de Wialliam Bialek, Université de Princeton. <http://www.princeton.edu/~wbialek/rome/lecture1.htm>

2.1.4. Polarisation de structures d'actine

La polarisation peut aussi apparaitre spontanément, dans un environnement initialement homogène. Ainsi, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une fluctuation spatiale stochastique de la concentration de la protéine Cdc42 augmente la probabilité de polymérisation de microfilaments d'actine, engendrant à son tour une accumulation de Cdc42, *via* un transport directionnel de la myosine⁴².

Une relaxation du cytosquelette lui-même peut aussi être à la base de brisures de symétrie. Ce mécanisme est observé par exemple dans les « blebbing cells », où une rupture ou un détachement de l'actomyosine de la membrane entraîne une protrusion de la cellule à l'endroit où le réseau d'actomyosine est affaibli⁴³ (Figure 18).

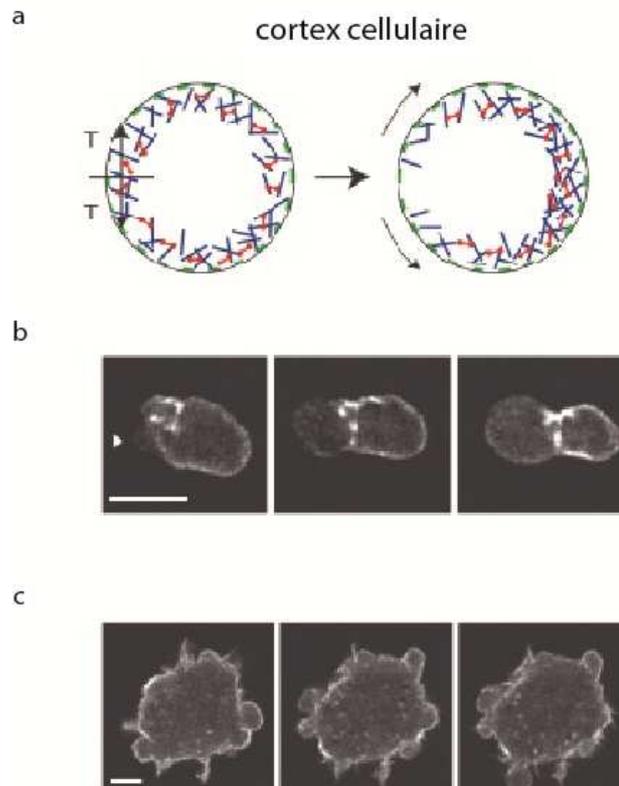


Figure 18 a, Schéma représentant la brisure du cortex cellulaire. b, Brisure du cortex et croissance du bleb en fonction du temps (une image toute les 20s). c, Cellule présentant plusieurs blebs (images prises à 0, 25 et 35 s). Tiré de [43]

Dans ces différents exemples, nous avons vu que l'architecture cellulaire est liée à la localisation spatiotemporelle de protéines de régulation. Des stimuli externes comme internes induisent cette localisation spatiotemporelle de protéines de signalisation, qui induit à son tour une réponse localisée du cytosquelette.

2.2. Hétérogénéité dans la distribution de protéines induite par diffusion ou transport actif

Le positionnement spatiotemporel des protéines dans une cellule peut se faire par différents mécanismes, allant du transport actif de molécules par les fibres du cytosquelette au transport par diffusion. Dans cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'influence d'un gradient de concentration de protéines de signalisation sur le cytosquelette (chapitre 3), au transport et la signalisation de molécules endocytées (chapitre 4) dans la cellule.

2.2.1. Établissement d'un gradient intracellulaire de protéines

2.2.1.1. Étude théorique d'un gradient de protéines de signalisation

Les protéines de signalisation peuvent, grâce à un processus de réaction/diffusion, former des gradients spatiaux de concentration⁴⁴ : Kholodenko *et al.* ont ainsi étudié les conditions théoriques pour obtenir un gradient de concentration de protéines^{45, 46}. Ils ont pour cela considéré un système chimique M1 à deux états, phosphorylé ou non. Une kinase phosphoryle M1 tandis qu'une phosphatase le déphosphoryle. La condition essentielle pour obtenir un gradient est d'avoir une séparation spatiale entre la kinase et la phosphatase, la protéine doit être activée par la kinase à un endroit et désactivée par la phosphatase à un autre (Figure 19).

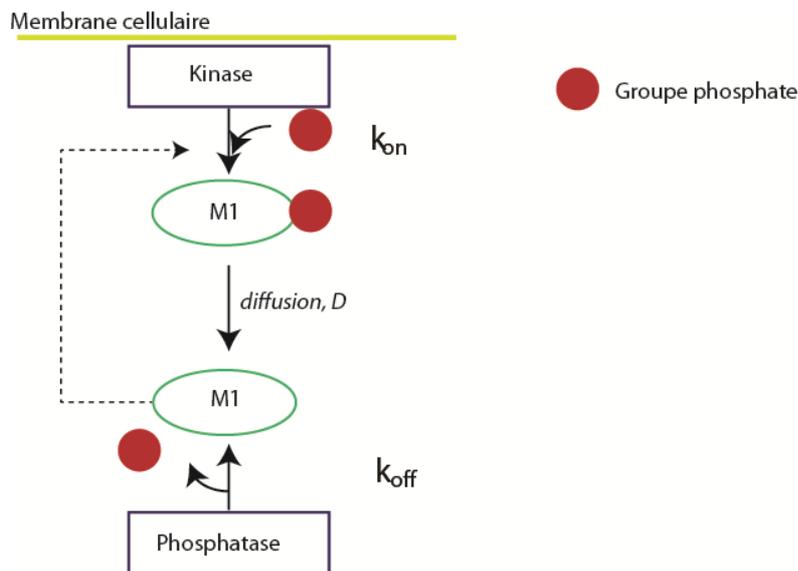


Figure 19 Exemple de formation d'un gradient de molécule à partir de la membrane cellulaire. Dans le cas des kinases, une molécule peut être activée à un endroit de la cellule (ici la membrane), diffuser et être désactivée à un autre endroit de la cellule. Ce processus conduit à la formation de gradient de concentration à l'intérieure de la cellule.

Prenons une cellule sphérique de rayon L. Si la kinase est localisée à la membrane, alors que la phosphatase est distribuée de manière homogène dans le cytoplasme, la concentration C_p de la protéine obéit à une équation de réaction-diffusion :

$$\frac{\delta C_p}{\delta t} = D\Delta C_p - k_{off} * C_p, \text{ avec } k_{off} \text{ le taux de déphosphorylation}$$

k_{on} , le taux de phosphorylation, n'intervient que dans la condition aux limites en $x=0$, $C_p(x=0) = C_p^0$ où C_p^0 est une fonction de k_{on} ⁴⁶.

Quand l'état stationnaire est atteint :

$$D\Delta C_p = k_{off} * C_p$$

La solution analytique de cette équation est du type⁴⁵

Introduction générale

$$Cp(x) = Cp^0 \left(\frac{e^{\alpha x} + e^{2La} e^{-\alpha x}}{1 + e^{2\alpha L}} \right), \text{ avec } \alpha^2 = \frac{k_{off}}{D}. \alpha^{-1} \text{ est la longueur caractéristique du gradient.}$$

Pour obtenir un gradient dans ces conditions, il faut donc $\alpha L \geq 1$.

On trouve un résultat équivalent pour une kinase localisée sur une structure supra-moléculaire et une phosphatase présente partout ailleurs dans le cytoplasme.

Si la protéine est maintenant impliquée dans une cascade de signalisation, cette cascade amplifie le signal par un effet domino, ce qui permet de propager les informations sur des distances plus longues que dans le cas précédent^{45, 47}. La figure 20 montre un exemple de cascade de signalisation à trois niveaux M1, M2, M3. M3 peut diffuser sur une distance plus grande que M1 et permettre une plus grande propagation du signal. Contrairement au cas précédent cette distance va maintenant dépendre de D , k_{off} , et k_{on} ^{45, 48}.

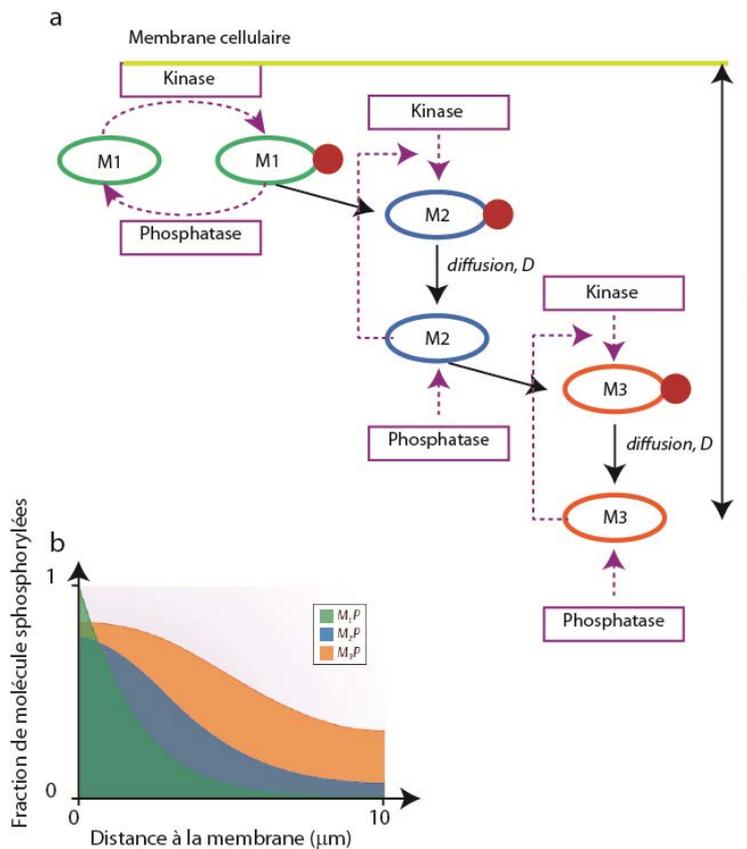


Figure 20 Génération de gradients dans le cas d'une cascade de signalisation. L'activité kinase de M1 est fixe (à la membrane par exemple). Les autres peuvent diffuser dans le cytoplasme. a, schéma représentant la cascade de signalisation à trois molécules : M1, qui est activé à la membrane, puis libre de diffuser avant d'être désactivée. M2 est activée par M1 et M3 par M2. La distance d atteinte par M3 depuis la membrane est plus importante que dans le cas précédent. b, Tiré de [45]. Simulation des distances à la membrane. M3 s'éloigne plus de la membrane, avec un gradient de concentration plus faible.

L'établissement de gradients de concentration de protéines est donc théoriquement possible à l'intérieur des cellules. Ils ont été mis en évidence théoriquement pour la cascade de signalisation Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) par exemple, qui est impliquée dans l'apoptose, la différenciation ou la mitose^{44, 49}. Des gradients ont été observés durant les différentes phases du cycle cellulaire. Par exemple pendant l'anaphase, un gradient de phosphorylation de la kinase AuroraB est supposé donner des informations spatiales pour la cytokinèse⁵⁰.

Durant ce travail de thèse, nous avons étudié le gradient de la protéine RanGTP qui se forme autour des chromosomes pendant la division cellulaire et permet de réguler dans l'espace l'auto-organisation du fuseau mitotique.

2.2.1.2. Exemple du gradient de RanGTP

Ran est une GTPase, qui est impliquée dans un certain nombre de fonctions cellulaires comme par exemple le trafic extranucléaire⁵¹. Un autre rôle de Ran est de contrôler l'assemblage correct du fuseau mitotique pendant la division cellulaire. En effet, il a été montré que RanGTP intervient dans la formation du fuseau mitotique⁵².

Durant la division cellulaire il est indispensable d'avoir un regroupement de tous les chromosomes le long du plan métaphasique. Les microtubules sont impliqués dans ce processus *via* le fuseau mitotique. Les composants principaux du fuseau mitotique sont les microtubules, les centrosomes et les chromosomes. Les microtubules sont organisés par les moteurs moléculaires, les centrosomes, les kinétochores et des protéines de régulations (MAPs : Microtubules Associated Proteins) (Figure 21).

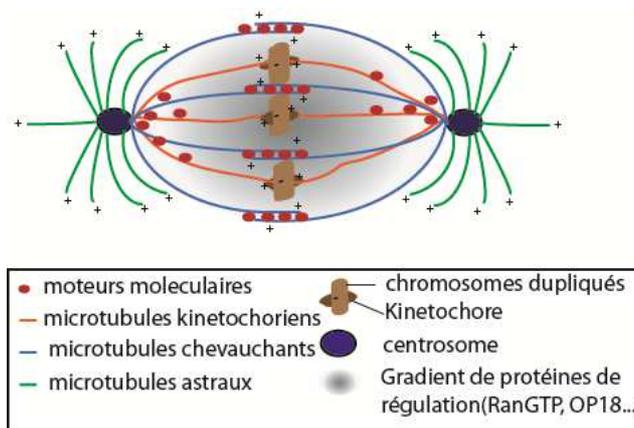


Figure 21 Le fuseau mitotique est organisé par les moteurs moléculaires, les centrosomes et les protéines de régulations.

Deux modèles principaux décrivent la formation du fuseau mitotique. Le premier est le modèle de « search and capture »⁵³. Dans ce modèle, les microtubules sont nucléés à partir des centrosomes, et explorent l'espace par polymérisation/dépolymérisation dans toutes les

directions. Quand ils rencontrent un chromosome, ils sont capturés et stabilisés par le kinétochore.

Ce modèle est cependant incomplet. En effet dans les cellules sans centrosome le fuseau s'assemble correctement. Le fuseau peut également s'assembler en l'absence de kinétochore ou autour de billes recouvertes de chromatine⁵⁴⁻⁵⁶. Ceci indique que les chromosomes jouent également un rôle actif dans l'assemblage du fuseau. Un second modèle a donc été introduit dans lequel les chromosomes stabilisent localement les microtubules. Cette stabilisation intervient en l'absence de contact direct entre les chromosomes et les microtubules, par le biais de protéines de régulations, parmi lesquelles la protéine RanGTP joue un rôle majeur. Dans ce modèle la distribution de protéines de régulation agit sur l'assemblage des structures du cytosquelette. Ran existe sous deux états, RanGTP, la forme active et RanGDP, la forme inactive. Ces deux états sont régulés par deux enzymes, RanGAP qui induit l'hydrolyse du GTP en GDP et RCC1, un facteur d'échange de guanine qui induit la phosphorylation du GDP (Figure 22).

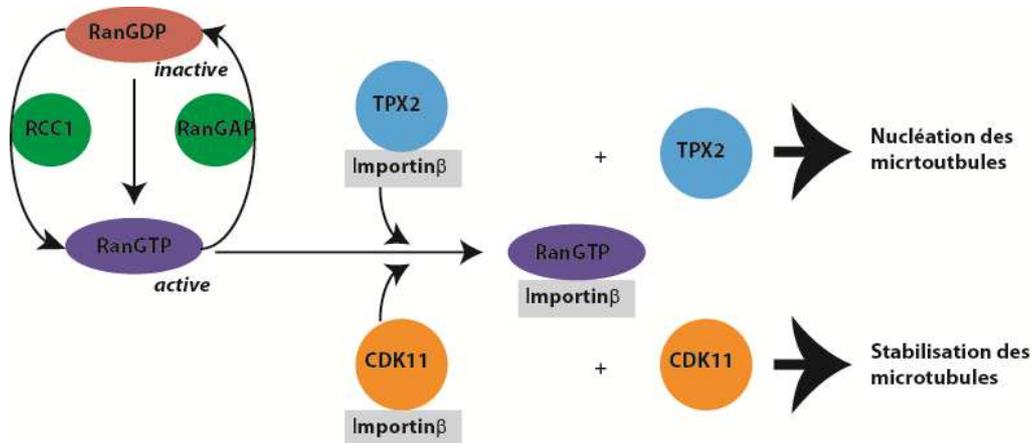


Figure 22 Voie de signalisation de Ran. RanGTP est activé par RCC1 et désactivé par RanGAP. Sous forme GTP Ran peut se lier à l'importin β et libérer TPX2, qui nucléé les microtubules et CDK11 qui les stabilise.

Durant la division cellulaire, RCC1 est localisé sur les chromosomes alors que RanGAP est dans le cytoplasme. Comme nous l'avons vu précédemment (Figure 19), ceci conduit à la formation d'un gradient de RanGTP : la protéine Ran est activée sous forme RanGTP au niveau des chromosomes, puis diffuse à travers le cytoplasme et est finalement désactivée sous forme RanGDP par RanGAP^{57, 58} (Figure 23).

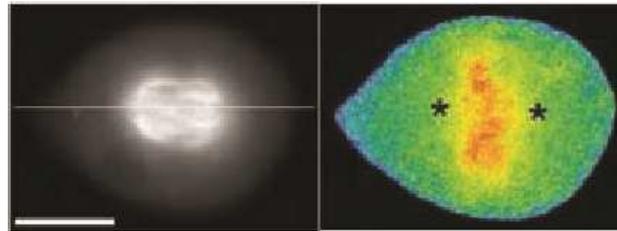


Figure 23 Visualisation du gradient de RanGTP dans des cellules HeLa. Gauche : fuseau mitotique, observé grâce à de la tubuline fluorescente. Droite : Gradient de RanGTP observé par FRET avec la protéine Rango. Les astérisques indiquent la position de fuseau. Tiré de [58]

Ce processus conduit à la formation du fuseau mitotique. Le gradient de RanGTP est impliqué dans l'assemblage du fuseau mitotique à travers différentes protéines, dont TPX2 qui contrôle la nucléation des microtubules et CDK11 qui les stabilise (Figure 22). Plus précisément RanGDP est phosphorylé par RCC1 au niveau de la chromatine pour donner RanGTP. RanGTP est alors capable de se lier à l'importin β qui va libérer ses cargos, dont font partis CDK11 et TPX2⁵⁹⁻⁶². Il est intéressant de noter que la liaison de RanGTP avec l'importin β va protéger RanGTP de l'action de RanGAP et va permettre au complexe RanGTP-importin β de diffuser loin de la chromatine avant d'être hydrolysé. Caudron et *al.* ont modélisé le gradient de RanGTP autour de la chromatine et ont trouvé une extension spatiale d'une dizaine de micromètres⁶³.

Le gradient de RanGTP est donc crucial pour l'assemblage correct du fuseau mitotique. Il est vu comme un « GPS » pour permettre le bon positionnement des microtubules qui est indispensable pour la division cellulaire⁶⁴. En effet, le gradient de RanGTP crée une symétrie radiale, qui va conduire à la symétrie bilatérale du fuseau, centrée sur les chromosomes^{63, 65}. Il a ainsi été montré que des billes recouvertes de RCC1 sont suffisantes pour générer la formation de fuseau dans des extraits cellulaires de Xénope en l'absence de centrosome et de chromatine⁶⁶.

Le fuseau mitotique a également un rôle pour définir la localisation de la division cellulaire et positionner l'anneau d'actine cortical lequel va conduire à la cytokinèse⁶⁷. Enfin, dans certaines cellules trop grandes pour que les microtubules capturent les chromosomes, l'actine entre en jeu, *via* un anneau d'actine rassemblant les chromosomes⁶⁸⁻⁷⁰.

Ce système montre donc un fort couplage entre les éléments du cytosquelette et la distribution spatiotemporelle de protéines de régulations permettant de créer une structure intracellulaire.

Une des parties majeure de cette thèse a été l'étude de ce gradient de RanGTP et de son influence sur les microtubules à l'aide de nanoparticules magnétiques.

2.2.2. Trafic intracellulaire et endocytose : rôle de la localisation spatiotemporelle

L'endocytose est un mécanisme par lequel la cellule internalise des molécules ou des particules présentes dans son environnement par invagination de la membrane plasmique. L'internalisation se fait au sein d'une vésicule. Une fois les vésicules détachées de la membrane plasmique, elles

fusionnent avec des endosomes et sont transportées par les moteurs moléculaires le long des microtubules. Le matériel endocyté est dirigé vers les endosomes précoces, il peut ensuite soit être recyclé à la membrane, soit être dirigé dans les endosomes tardifs puis les lysosomes pour dégradation (Figure 24).

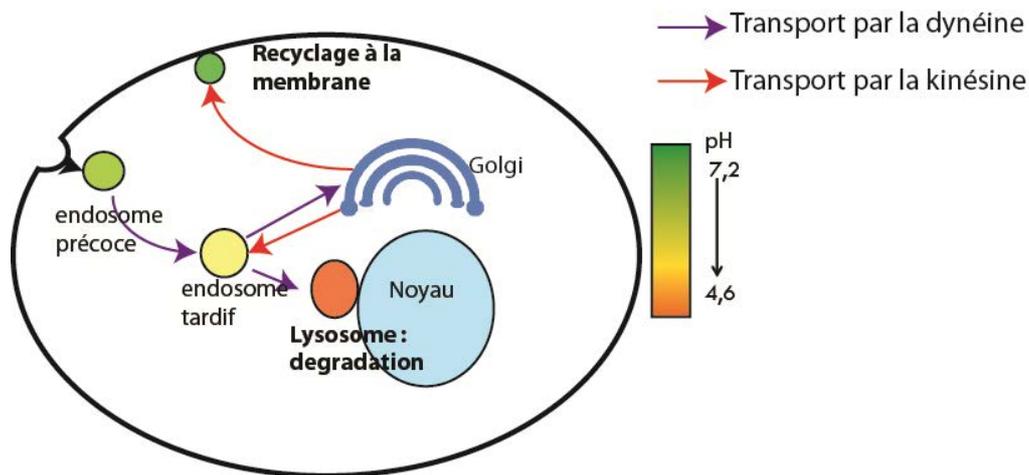


Figure 24 Mécanisme d'endocytose. Des éléments de l'environnement cellulaire sont internalisés par la cellule dans des vésicules, qui fusionnent ensuite avec des endosomes et sont transportées par les moteurs moléculaires le long des microtubules. Le matériel endocyté est dirigé vers les endosomes précoces, il peut ensuite soit être recyclé à la membrane, soit être envoyé dans les endosomes tardifs puis les lysosomes pour dégradation.

L'endocytose peut être spécifique (déclenchée par des ligands qui activent des récepteurs) ou non. Dans le cas de l'endocytose spécifique, la vision classique du mécanisme est la suivante : une activation des récepteurs par les ligands entraîne l'activation d'une cascade de signalisation, suivie par l'endocytose des récepteurs liés aux ligands et la dégradation de ceux-ci. Dans ce modèle l'endocytose n'est qu'un moyen de terminer le signal en dégradant les récepteurs activés⁷¹.

Cependant, il a été montré que l'activité de signalisation des récepteurs dépend de l'activation à la membrane mais également de la localisation cellulaire et de la durée d'émission du signal^{72, 73}. En d'autres termes, les récepteurs peuvent dans certains cas garder une activité de signalisation après l'endocytose. La signalisation se situe alors à la membrane des endosomes, qui sont appelés endosomes de signalisation^{74, 75}.

L'endocytose permet une régulation spatiale et temporelle de la signalisation. En effet, la réponse biologique dépend de la durée de la signalisation. Cette durée dépend du nombre d'endosomes recyclés par rapport à ceux qui sont dégradés aux lysosomes, c'est-à-dire du tri effectué dans les endosomes précoces⁷², mais également de la durée d'émission du signal par les endosomes de signalisation, après endocytose. La régulation spatiale se fait *via* le transport intracellulaire des endosomes. L'endocytose peut dans certains cas être un moyen de transporter des molécules avec

plus grande efficacité que la diffusion. Comme nous l'avons vu précédemment, un processus de réaction-diffusion permet de transporter des protéines activées sur une distance de l'ordre de quelques micromètres. Les cellules eucaryotes ont un rayon de 5 à 50 μm , ce mécanisme n'est pas forcément suffisant pour propager un message sur des longues distances. L'internalisation des récepteurs et leur transport dans les endosomes par les microtubules peut donc être un moyen efficace de propager le signal^{45, 76, 77}. Si ce mécanisme a été observé originellement pour les neurones - à cause des longues distances séparant les axones du corps cellulaire, la diffusion ne pouvait pas expliquer la vitesse et la distance parcourue par les protéines de signalisation^{75, 78, 79} - il a également été observé pour d'autres types cellulaires. Il a ainsi été montré que l'EGFR (récepteur de l'Epidermal Growth Factor) pouvait être envoyé au noyau à partir des endosomes précoces⁸⁰.

La localisation spatiale et temporelle des endosomes de signalisation semble donc extrêmement importante, autant pour contrôler le nombre de récepteurs dégradés que pour positionner une information de signalisation dans la cellule. Pour confirmer cette hypothèse, Taub *et al.* ont changé la position d'endosomes par rapport au noyau en sur-exprimant p50 une sous-unité de la dynamitin qui empêche le transport par la dynéine (Figure 25). Ils ont ensuite observé les effets sur la signalisation de l'EGFR et sur celle de MPAK, induite par l'EGFR⁸¹.

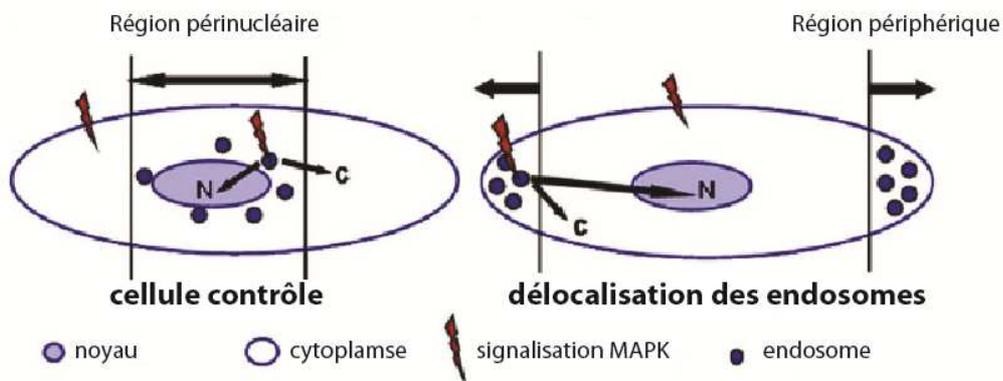


Figure 25 Distribution des endosomes dans les cellules normales (gauche) et dans les cellules sur-exprimant p50 (droite). Modifié à partir de [81].

Ils ont observé que la délocalisation des endosomes prolongeait la durée du signal de l'EGFR. Ils ont ensuite regardé l'effet sur les MPAK et notamment sur l'ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) : la signalisation était délocalisée et sa durée allongée.

Les auteurs ont ensuite utilisé une autre voie pour délocaliser les endosomes. Ils ont utilisé Rab7 qui a permis d'agréger les endosomes au noyau (Figure 26).

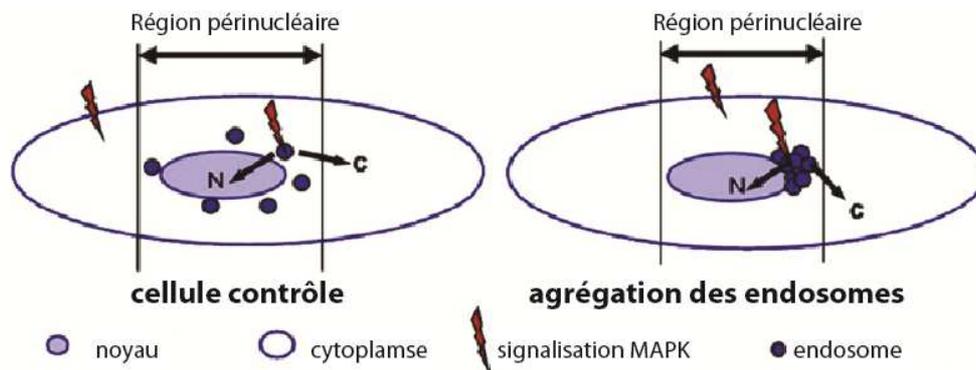


Figure 26 Distribution des endosomes dans les cellules normales (gauche) et dans les cellules sur-exprimant p50 (droite). Modifié à partir de [81].

Ils ont encore une fois observé un allongement de la durée de signalisation de l'EGFR, mais cette fois-ci la durée de signalisation de l'ERK était diminuée. Ils ont ainsi montré dans cette étude l'importance de la localisation spatiotemporelle des endosomes.

Durant ce travail de doctorat nous avons développé des méthodes alternatives pour étudier l'influence de la localisation intracellulaire des endosomes en utilisant des nanoparticules magnétiques.

3. Méthodes permettant d'étudier les cascades de signalisation

Cette section s'appuie sur un article de revue que nous avons écrit pour le journal WIREs Nanomedicine.

Nous avons vu que la localisation intracellulaire des protéines de signalisation pouvait avoir une grande importance dans le fonctionnement cellulaire. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes pour étudier la dynamique spatiotemporelle de ces cascades de signalisation. Un grand nombre de méthodes se développent parmi lesquelles l'utilisation de nanoparticules magnétiques occupe une place croissante. Nous allons ici donner quelques-unes des techniques utilisées pour étudier les protéines de signalisation, avant de nous arrêter plus en détail sur l'utilisation des nanoparticules magnétiques dans ce domaine.

Le développement de sondes fluorescentes (biosensors) a permis l'observation directe des interactions entre les protéines et de leur localisation cellulaire. Parmi ces biosensors, on peut citer les sondes de type FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Le FRET est un processus par lequel de l'énergie est transférée d'un donneur à un accepteur si les protéines interagissent (c'est-à-dire si elles sont suffisamment proches l'une de l'autre). Si on utilise des molécules fluorescentes, ce transfert s'accompagne d'un changement de fluorescence qui sera alors un rapporteur de l'interaction entre protéines. Les sondes FRET ont permis, entre autre, d'observer l'activation de GTPase et de kinases et donc d'observer des cascades de signalisation^{82, 83}. La sonde Rango (Ran-regulated importin- β cargo) par exemple, se lie à l'importin- β . En présence de

RanGTP, Rango se dissocie de l'importin β , ce qui change la fluorescence. Rango est donc un rapporteur de la liaison RanGTP-importin- β ⁵⁸.

Une autre approche consiste à perturber l'action des protéines de signalisation avec une bonne résolution spatiotemporelle. Plusieurs méthodes ont ainsi été développées. La microfluidique par exemple peut être utilisée pour contrôler précisément l'environnement extracellulaire. La chimiotaxie, la migration ou la croissance de cellules placées dans des gradients de biomolécules ont ainsi pu être étudiés⁸⁴. La microfluidique permet également d'étudier précisément des voies de signalisation. Dans une étude de 2012, Lin *et al.* ont déclenché et contrôlé un gradient intracellulaire de Rac, une protéine impliquée dans la polymérisation de l'actine, avec un gradient externe de rapamycine, une molécule perméante à la membrane plasmique⁸⁵. Le contrôle de ce gradient par microfluidique a permis de diriger la polarité et la direction de migration des cellules. Cependant, cette méthode n'est applicable que pour des gradients induits en utilisant des molécules perméantes contrôlant un événement intracellulaire.

L'utilisation de techniques optiques est en forte croissance, car ces méthodes sont non invasives et permettent une résolution spatiotemporelle allant de la seconde au jour et du micromètre au centimètre⁸⁶. Il est ainsi possible, en utilisant des éléments photosensibles de perturber la production, la localisation, la dégradation ou encore l'activation de protéines⁸⁶. La photosensibilité peut être encodée génétiquement. Des protéines présentes dans les plantes telles que les phytochromes permettent ainsi, dans les cellules transfectées, une dimérisation avec d'autres protéines due à un changement de conformation. Ce système a été utilisé par Levskaya *et al.* pour induire une activation localisée à la membrane de Rac, un nucléateur de l'actine (Figure 27)⁸⁷.

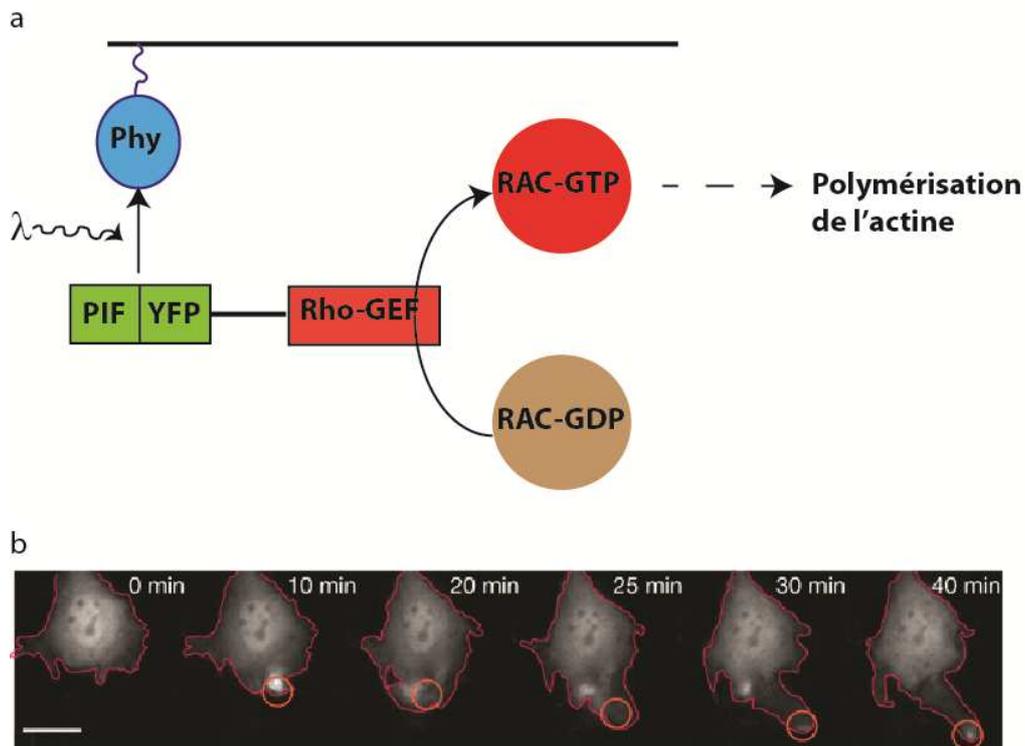


Figure 27 Contrôle spatiotemporel de l'activité de signalisation d'une cellule par optogénétique. a, Illuminé, Phy change de conformation et peut se lier à PIF. PIF a été fusionné à Rho-GEF qui active Rac, un nucléateur de l'actine. L'illumination de Phy entraîne donc l'activation localisée de Rac et donc la polymérisation de l'actine. b, Illumination d'un compartiment précis de la cellule (cercle rouge) qui entraîne une polymérisation localisée de l'actine. Photos tirées de [87]

Ces méthodes optogénétiques permettent un réel contrôle spatiotemporel de cascades de signalisation. Cependant elles exigent également un grand effort d'ingénierie de protéines pour chaque nouveau système de signalisation étudié.

Dans cette thèse nous nous sommes intéressées à une méthode alternative qui s'est développée ces dernières années, l'utilisation de nanoparticules magnétiques fonctionnalisées pour perturber les cascades de signalisation.

4. Nanoparticules magnétiques

4.1. Utilisation des nanoparticules magnétiques en biologie

Les nanoparticules magnétiques sont largement utilisées en biologie. Nous allons donner quelques exemples de ces utilisations.

4.1.1. Imagerie par résonance magnétique

L'IRM est une technique qui s'appuie sur la différence dans la relaxation magnétique des spins d'atomes d'hydrogène soumis à un champ magnétique. Le temps sera différent selon que les

hydrogènes sont présents dans l'eau ou dans les lipides. Les nanoparticules magnétiques sont utilisées comme agents de contrastes négatifs, en modifiant localement le temps de relaxation des protons autour d'elles⁸⁸.

4.1.2. Séparation

Des nanoparticules fonctionnalisées avec des molécules spécifiques sont utilisées pour cibler et séparer des composants de milieux hétérogènes. Il est par exemple possible de trier avec cette technique des globules rouges, des cellules souches, des cellules cancéreuses ou encore des organelles⁸⁹⁻⁹². Les éléments triés sont ensuite analysés ou utilisés avec des visées d'applications thérapeutiques. La société Mitenyi vend ainsi depuis les années 90 un système fait de nanoparticules magnétiques de 50 nm et d'une colonne de séparation permettant de trier les cellules avec des applications médicales.

4.1.3. Thérapie

Durant les trente dernières années, des expériences ont été menées pour utiliser les nanoparticules magnétiques comme vecteurs de médicaments, permettant de cibler précisément la zone à traiter. Les nanoparticules sont fonctionnalisées avec un agent thérapeutique et injectées dans le système sanguin. Elles sont ensuite localisées dans la zone à traiter grâce à un aimant. Cette méthode permet de diminuer les effets secondaires de certaines thérapies en permettant de réduire la concentration d'agents actifs. Cette méthode a été testée chez le rat, le lapin ou encore le porc⁹³⁻⁹⁵.

Une autre stratégie consiste à appliquer une hyperthermie locale sur le tissu ciblé. Les nanoparticules magnétiques portent des biomolécules qui vont cibler spécifiquement les cellules du tissu à traiter (le plus souvent une tumeur). Elles peuvent également être injectées directement dans le tissu. Un champ radiofréquence permet alors d'appliquer une hyperthermie qui va détruire le tissu malade. L'énergie à appliquer pour exciter les nanoparticules n'est pas suffisante pour abimer les tissus environnant qui n'ont pas été ciblés par les nanoparticules⁹⁶. L'efficacité de cette technique dépend du type, de la taille et de la forme des nanoparticules⁹⁷. Cette technique est utilisée aujourd'hui chez l'homme pour soigner les tumeurs du cerveau. La société MagForce commercialise en Allemagne un ferrofluide qui est injecté directement dans la tumeur et permet une hyperthermie locale⁹⁸.

4.1.4. Mesures physiques

Les nanoparticules magnétiques permettent l'application de forces sur des objets biologiques.

Des pinces magnétiques ont, par exemple, été utilisées pour étirer une molécule d'ADN⁹⁹.

Les nanoparticules magnétiques peuvent aussi être utilisées pour étudier la mécanique des cellules¹⁰⁰. Il est tout d'abord possible d'attacher des particules magnétiques à la surface de cellules et de mesurer des forces à l'aide d'une pince magnétique^{101,102}. On peut également faire des mesures intracellulaires, en utilisant des phagosomes ou des endosomes magnétiques ou

encore des bâtonnets magnétiques¹⁰³⁻¹⁰⁷. Ces différentes méthodes ont permis d'apporter des informations sur la mécanique des cellules et d'étudier leurs propriétés viscoélastiques.

4.1.5. Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire vise à créer *in vitro* des tissus cellulaires pour remplacer des tissus abîmés. Dans ce domaine, une stratégie consiste à réaliser un assemblage 3D de cellules. Pour cela, des cellules magnétiques (c'est-à-dire des cellules marquées par des nanoparticules magnétiques) peuvent être utiles. En effet, diriger des cellules avec un champ magnétique peut permettre de contrôler avec précision leur assemblage¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

4.2. Activation magnétique de voie de signalisation

Ces dernières années les nanoparticules magnétiques ont commencé à être utilisées pour activer des voies de signalisations. Le champ magnétique est utilisé pour induire l'agrégation de nanoparticules magnétiques biologiquement actives (c'est-à-dire sur lesquelles sont greffées les protéines d'intérêts), pour appliquer des forces ou encore pour les organiser spatialement (Figure 28).

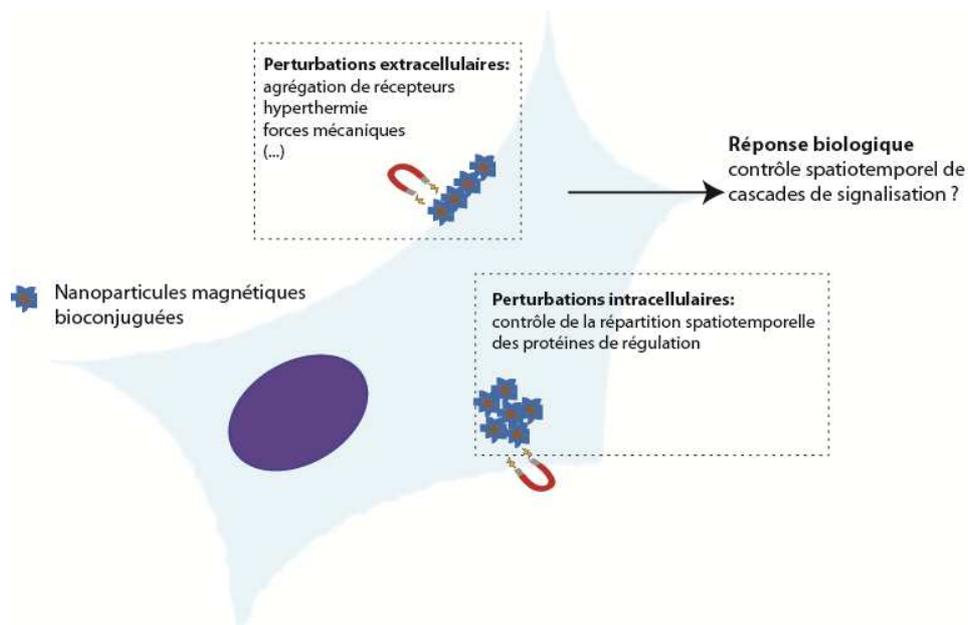


Figure 28 Utilisation des nanoparticules magnétiques pour contrôler des voies de signalisation. Deux stratégies sont possibles : la première consiste à activer des récepteurs extérieurs à la cellule, la deuxième à contrôler directement des cascades intracellulaires.

4.2.1. Activation magnétique de récepteurs en surface des cellules

La première stratégie consiste à agir sur des récepteurs se trouvant à la surface des cellules (Figure 28). La simple application de forces sur les récepteurs grâce à un champ magnétique peut

entraîner l'ouverture du canal auquel ils sont reliés et donc le passage d'ions dans la cellule ^{111, 112} (Figure 29,a).

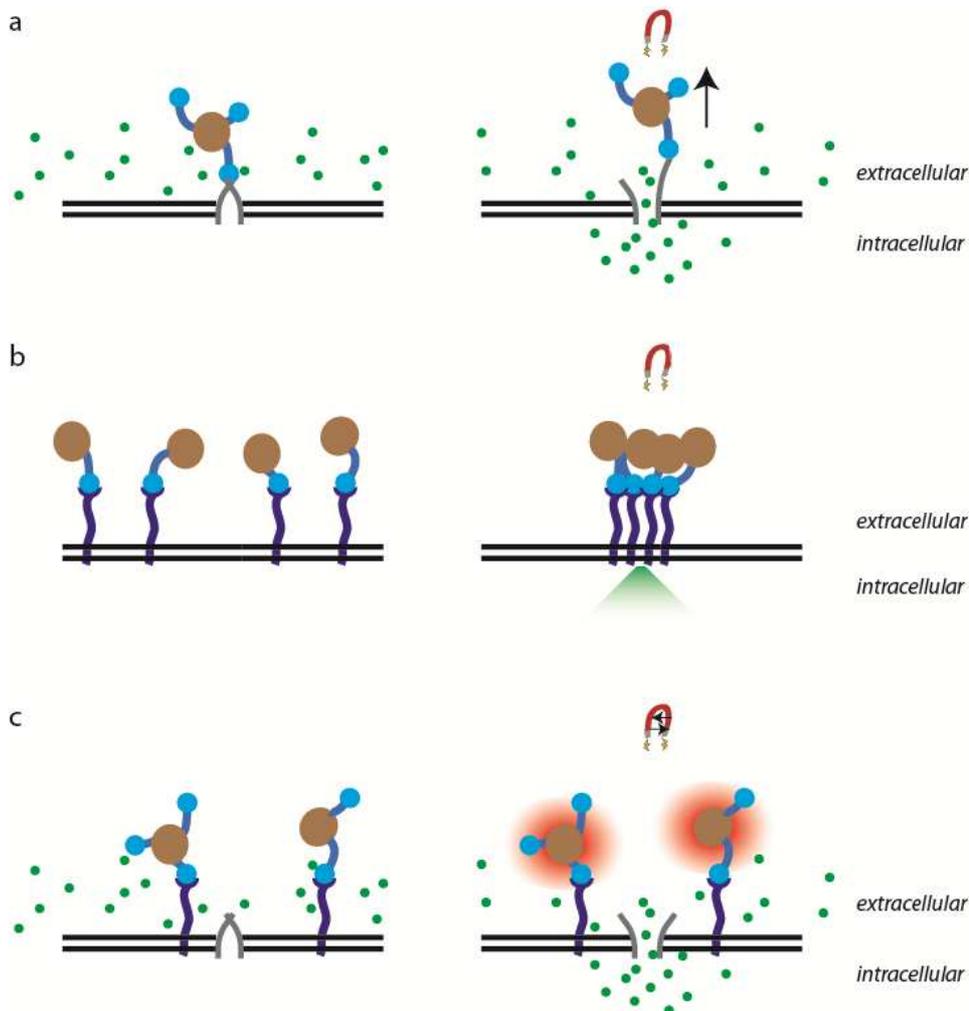


Figure 29 Activation magnétique de la signalisation. a, Activation par une force exercée sur les récepteurs. b, Activation par oligomérisation des récepteurs. c, Activation par hyperthermie.

Certaines cascades de signalisation transmembranaires, celles régulant la production d'insuline ou la mort programmée par exemple, sont contrôlées par l'oligomérisation de récepteurs à la surface des cellules^{113, 114}. Cibler ces récepteurs avec des nanoparticules spécifiquement fonctionnalisées permet de contrôler l'ouverture de canaux grâce à un champ magnétique et donc d'activer une voie de signalisation et d'induire une réponse biologique (Figure 29, b).

Mannix *et al.* ont ainsi induit des flux de calcium en agrégeant magnétiquement des récepteurs¹¹⁵. Cho *et al.* ont utilisé cette méthode *in vivo*, ils ont provoqué de manière sélective l'apoptose dans des embryons de poisson zèbre¹¹⁶. Récemment Bharde *et al.* ont activé la cascade de signalisation de l'EGFR sans ligand, par simple agrégation de récepteurs¹¹⁷.

Les cascades transmembranaires peuvent aussi être déclenchées par hyperthermie (Figure 29, c). Le canal TRPV1, par exemple est activé à 42 °C. Huang *et al.* ont ainsi utilisé les propriétés physiques des nanoparticules magnétiques pour imposer, avec un champ magnétique radiofréquence, une augmentation locale de température aux canaux TRPV1 et provoquer un flux de calcium¹¹⁸.

Cette méthode a récemment été étendue par Stanley *et al.* et Yamaguchi *et al.*^{119, 120}. Stanley *et al.* ont utilisé un promoteur synthétique sensible aux ions calciums. Comme précédemment des nanoparticules ciblant les canaux TRPV1 ont été soumises à un champ radiofréquence, entraînant une hyperthermie des récepteurs, une ouverture des canaux laissant passer les ions calcium et *in fine* l'activation du gène. Yamaguchi *et al.* ont eux contrôlé l'expression génétique en utilisant directement un promoteur sensible à la température¹²⁰. Ils ont montré qu'une élévation de température de 6 à 8 °C pouvait induire l'expression du gène et dans leur cas inhiber la croissance d'une tumeur aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

4.2.2. Contrôle magnétique d'une cascade de signalisation intracellulaire

Une deuxième stratégie consiste à contrôler directement une voie de signalisation intracellulaire sans passer par des récepteurs extracellulaires. Etoc *et al.* ont ainsi utilisé des nanoparticules magnétiques couplées avec TIAM1, un facteur d'échange de guanine qui active Rac1 et est impliqué dans la nucléation de l'actine dans les cellules NIH3T3¹²¹. Ils ont fonctionnalisé leurs nanoparticules *in situ* en utilisant une technique récente qui permet de surexprimer une protéine cytoplasmique (ici TIAM1) fusionnée avec une protéine HaloTag qui va cibler la surface des nanoparticules (Figure 30). Si cette méthode permet une liaison covalente entre la protéine d'intérêt et la bille magnétique, sa limite vient de la difficulté à connaître précisément la stœchiométrie du couplage.

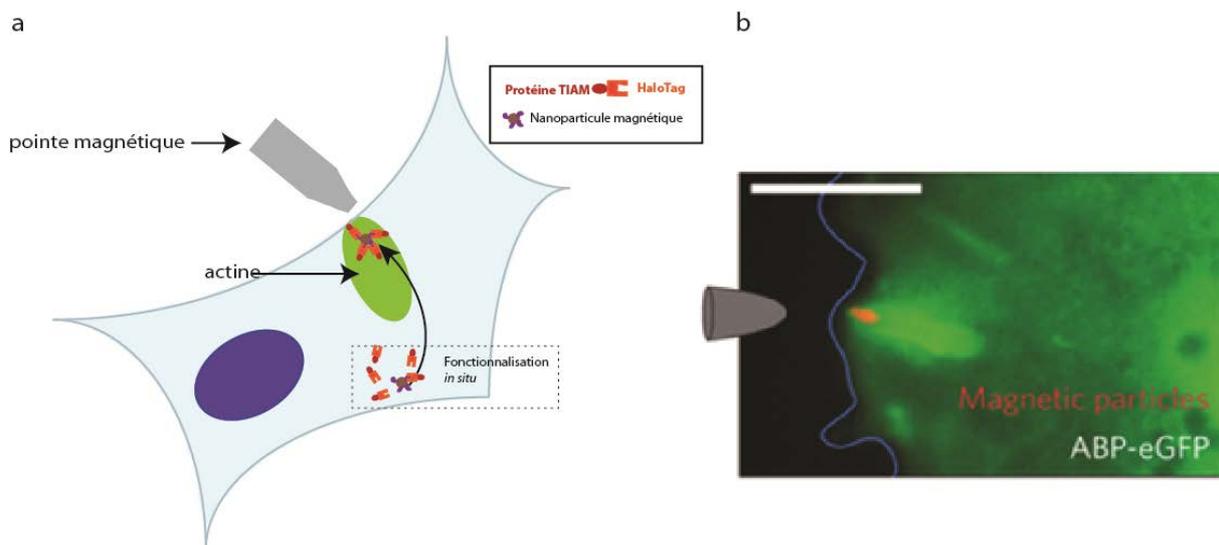


Figure 30 Contrôle magnétique de l'activité de Rac. a, Principe de l'expérience. b, Visualisation de la nucléation de l'actine sur la nanoparticule magnétique. Tiré de [121]

En déplaçant la nanoparticule fusionnée à TIAM1 dans la cellule ils ont montré la nucléation de microfilaments d'actine n'apparaissait qu'à des endroits très précis correspondant aux lamellipodes. L'activité des cascades de signalisations est donc extrêmement dépendante de leur localisation.

Hoffmann *et al.* ont créé un « interrupteur » magnétique sur lequel s'est en partie appuyé mon travail de thèse¹²². Ils ont contrôlé magnétiquement la nucléation de microtubules dans des gouttes d'extrait cellulaire de Xénope à l'aide de nanoparticules.

Dans des extraits cellulaires de Xénope, RanGTP induit la formation de microtubules qui s'auto-assemblent en structures radiales appelées asters grâce à des moteurs dynéines⁶³. Cette formation d'asters intervient pour une concentration de RanGTP supérieure à un seuil de 4 μM .

L'agrégation de nanoparticules magnétiques (120 nm de diamètre) conjuguées à la protéine RanGTP a permis de passer au-dessus du seuil de concentration induisant la formation et l'auto-organisation d'asters de microtubules (Figure 31).

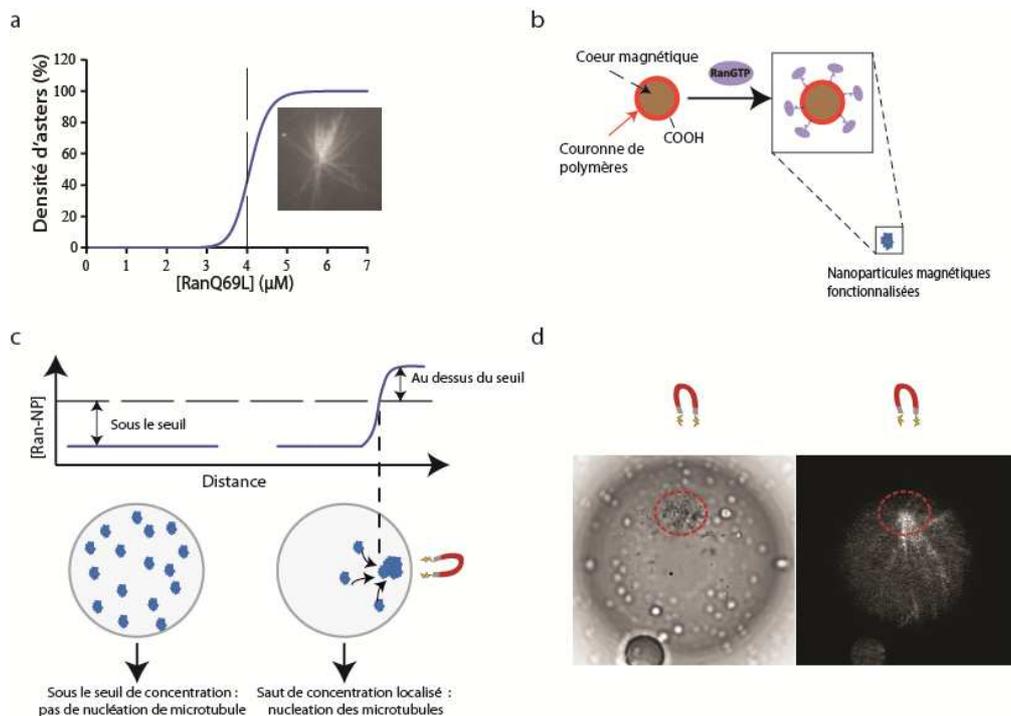


Figure 31 Interrupteur magnétique. a, Dans des extraits cellulaires de Xénope, RanGTP induit la formation d'asters avec un comportement d'interrupteur : la formation d'aster apparaît au-dessus d'un seuil de concentration. b, Des nanoparticules magnétiques sont couplées avec RanGTP. c, Principe de l'expérience : les nanoparticules magnétiques couplées à RanGTP sont dispersées dans l'extrait à une concentration inférieure au seuil de formation des asters. Avec un aimant les nanoparticules sont agrégées et la concentration en RanGTP passe au-dessus du seuil. d, Nucléation d'un aster localisé sur l'agrégat de nanoparticule.

Introduction générale

Dans cette configuration, avec une forte localisation de RanGTP, les asters étaient localisés sur l'agrégat de nanoparticules.

Ils ont ensuite réalisé la même expérience avec des nanoparticules couplées avec RCC1 (Figure 32). Nous avons vu précédemment que RCC1 est un activateur de RanGTP (Figure 23). Les asters n'étaient plus dans ce cas systématiquement localisés sur les nanoparticules.

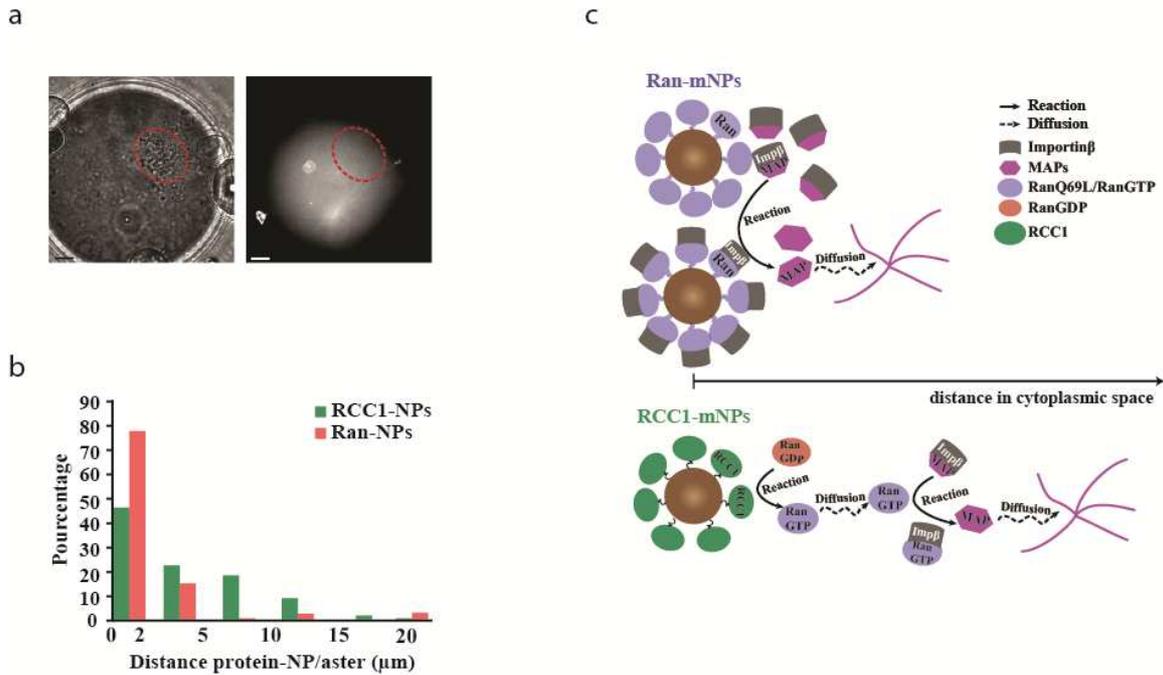


Figure 32 Nanoparticules couplées à RCC1. a, aster formé à partir de nanoparticules couplées à RCC1. b, Localisation des asters par rapport à l'agrégat de nanoparticules pour RanGTP et RCC1. c, Système de réaction-diffusion pour RanGTP et RCC1. Tiré de [122]

Une autre utilisation des nanoparticules, qui nous a également intéressés durant cette thèse, concerne les endosomes magnétiques. En effet les endosomes sont utilisés par les neurones pour communiquer sur de longues distances⁷⁹. Par endocytose, Sketete *et al.* ont spécifiquement chargé des endosomes stimulant la croissance des neurones avec des nanoparticules magnétiques¹²³. Ils ont ainsi été capables de stopper la croissance des neurones en délocalisant ces endosomes du cône de croissance au soma (Figure 33).

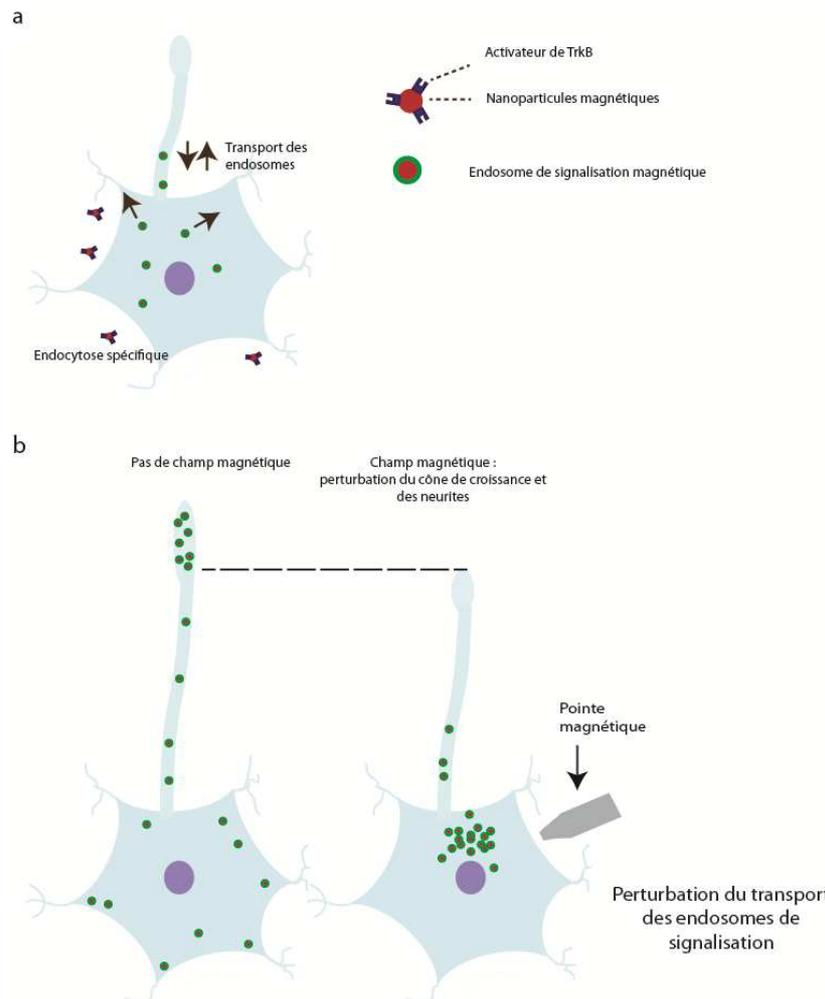


Figure 33 Contrôle magnétique de la croissance des neurones. (a) Les nanoparticules magnétiques sont conjuguées à l'anticorps anti-TrkB 29D7, qui induit l'activation de TrkB et l'endocytose spécifique des nanoparticules magnétiques dans des endosomes de signalisation TrkB. (b) Les nanoparticules magnétiques sont utilisées pour contrôler la localisation spatiale des endosomes TrkB. Sans champ magnétique on a une croissance normale des neurites et du cône de croissance. En présence d'un champ magnétique les endosomes sont délocalisés et se retrouvent majoritairement dans le corps cellulaire, ce qui arrête la croissance.

Organisation du manuscrit

Durant ce travail de thèse nous avons étudié l'influence de la localisation spatiotemporelle de protéines de signalisation dans différents cas.

Le chapitre 2 présente les différentes procédures expérimentales utilisées et mises au point pendant ce travail.

Dans le chapitre 3 nous présentons une nouvelle méthode pour générer directement un gradient de protéines, en utilisant des nanoparticules magnétiques. Nous avons utilisé cette méthode pour étudier dans un système minimal (extrait cellulaire de *Xénope* confiné dans des gouttes) l'influence d'un gradient de RanGTP sur le positionnement d'un aster de microtubules, qui est une question importante pour étudier la division cellulaire (Figure 34, a).

Dans le chapitre 4 nous présentons nos résultats préliminaires de mise au point des méthodes magnétique pour perturber et délocaliser des cascades de signalisation dans des cellules, en nous focalisant sur la dégradation de l'Epidermal Growth Factor (Figure 34, b).

Dans un projet, conceptuellement un peu différent, nous avons étudié le transport et la concentration de protéines de signalisation, en utilisant non plus un actuateur magnétique mais les propriétés d'auto-organisation du cytosquelette (ici les propriétés de contraction d'un réseau d'actine) (Figure 34, c). Les résultats préliminaires de ce projet sont présentés en annexe

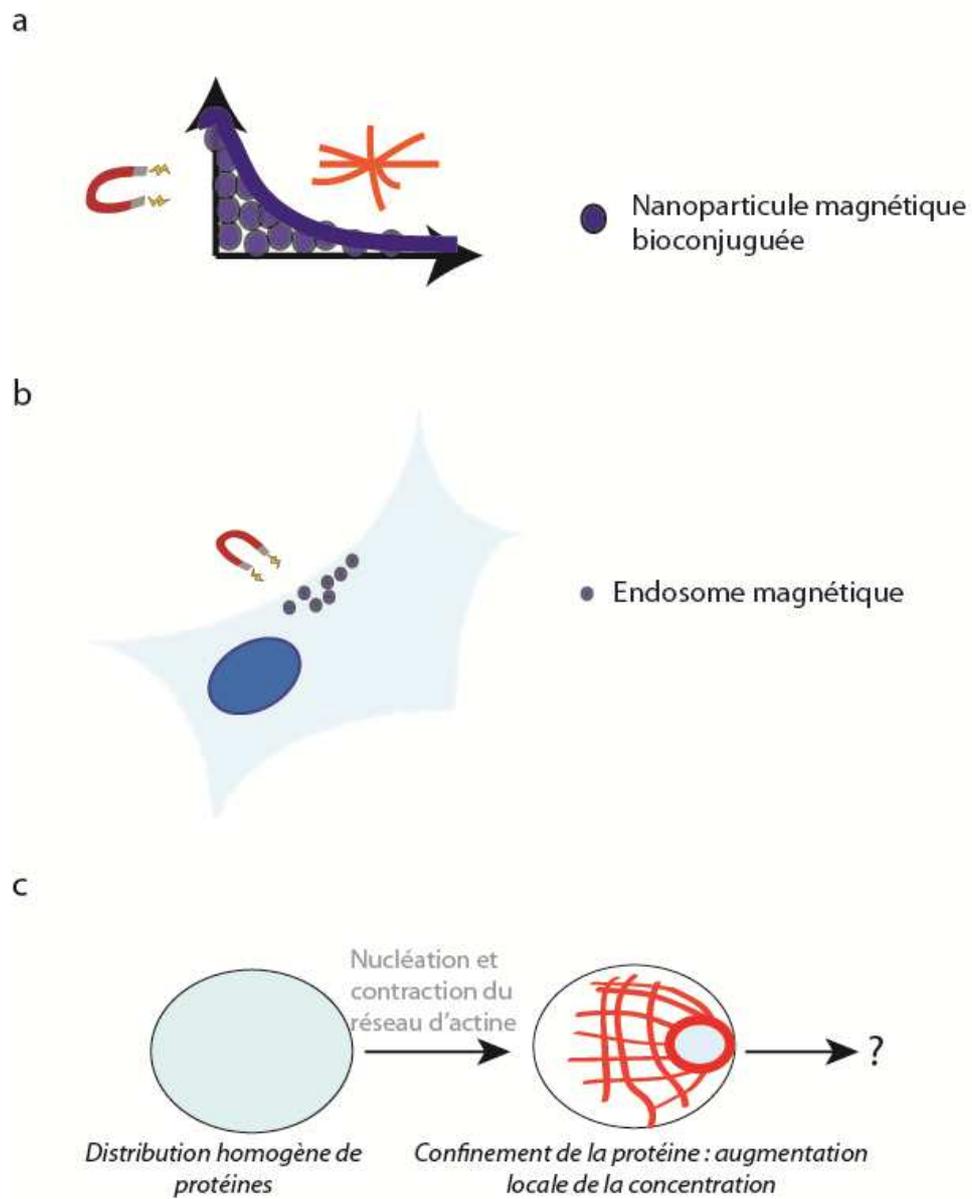


Figure 34 Les différents projets menés durant ce travail de thèse. a, Génération d'un gradient de protéines. b, Étude de la localisation d'endosomes de signalisation. c, Utilisation d'un réseau d'actine pour confiner des protéines de signalisation.

Chapitre 2 Matériel et méthodes

1. Nanoparticules magnétiques	43
2. Expression et purification de protéines recombinantes	43
2.1. Transformation	43
2.2. Induction	44
2.3. Purification	44
3. Greffage de molécules sur les nanoparticules	45
3.1. Greffage du RanQ69L	45
3.2. Greffage du PEG-PLL fluorescent	45
3.3. Greffage de l'Epidermal Growth Factor	45
3.4. Greffage à la surface des nanoparticules de diamètre supérieur à 100 nm	45
3.5. Greffage a la surface des nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nm	46
4. Dispositif de microscopie	46
5. Extrait cellulaire de Xénope	46
5.1. Le Xenopus laevis	46
5.2. Préparation des extraits cellulaire de Xénope	47
5.2.1. Déclenchement de la ponte.....	47
5.2.2. Rinçage et dégangage	47
5.2.3. Centrifugation.....	48
5.3. Polymérisation des microtubules et assemblage des asters	49
5.3.1. Tubuline fluorescente	49
5.3.2. Système régénérateur d'énergie	49
5.3.3. Nucléation et auto assemblage des microtubules.....	49
5.3.4. Fixation des échantillons.....	50
5.4. Polymérisation et observation des filaments d'actine	50
5.4.1. Observation de l'actine	50
5.4.2. Perturbation de l'actine	50
5.5. Encapsulation des extraits	50
6. Gradient de nanoparticules magnétiques	51
6.1. Dispositif expérimental	51

Matériels et méthodes

6.2.	Détermination de la concentration des nanoparticules.....	51
7.	<i>Etude de la localisation d'endosomes magnétique dans des cellules HeLa.....</i>	<i>53</i>
7.1.	Endocytose de nanoparticules magnétiques	54
7.2.	Immunofluorescence : détection du récepteur EGFR.....	54
7.3.	Pointe magnétique	54
7.4.	Perturbation du cytosquelette.....	55

Dans tout le chapitre Matériels et Méthodes, si la compagnie fournissant les produits n'est pas indiquée, c'est qu'il s'agit de Sigma-Aldrich. Les autres compagnies sont précisées.

1. Nanoparticules magnétiques

Durant cette thèse nous avons utilisé plusieurs types de nanoparticules magnétiques :

-les nanoparticules NanoCs, 30 nm de diamètre, fluorescentes (FITC) avec des acides carboxyliques ou du PEG en surface (Figure 35).

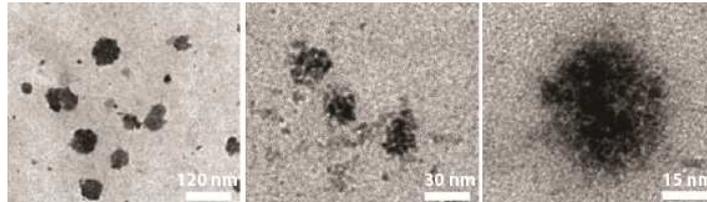


Figure 35 Image TEM des nanoparticules magnétiques NanoCs. Images : S. Casal, UPMC. Microscope : Jeol JEM 100CX

-les nanoparticules Micromod, avec des acides carboxyliques en surface, 50 nm de diamètre.

-les nanoparticules Ademtech, avec des acides carboxyliques en surface, 120 nm et 300 nm de diamètre (Figure 36).

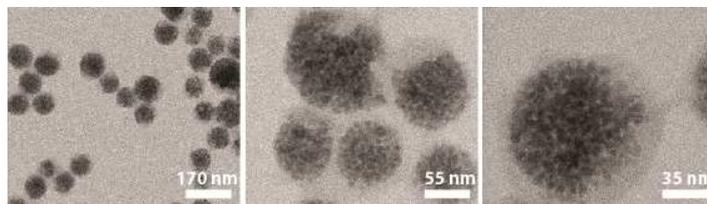


Figure 36 Image TEM des nanoparticules Ademtech, 120 nm. Images : E. Mazari et L. Largeau, LPN. Microscope : Jeol 2200FS

-les nanoparticules Magnamedics, avec des acides carboxyliques en surface, 1 μm de diamètre.

Grâce aux acides carboxyliques il est possible de greffer des molécules en surface des nanoparticules.

2. Expression et purification de protéines recombinantes

2.1. Transformation

Les protéines recombinantes sont produites par des bactéries *Escherichia coli* du type BL21. Pour la protéine RanQ69L deux plasmides sont insérés dans les bactéries par électroporation (1700V, 6 ms). Le plasmide d'expression RanPQE (qui nous a été donné par Iain Mattaj, EMBL) qui porte le gène de la protéine RanQ69L-6xHis-Tag et le plasmide répresseur PREP4 qui régule

l'expression du système PQE. Le PREP4 donne une résistance à la kanamycine et le PQE une résistance à l'ampicilline.

Les bactéries poussent ensuite une nuit sur une plaque contenant les deux antibiotiques à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour l'ampicilline et 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la kanamycine.

2.2. Induction

Un clone est prélevé sur la plaque, et est mis en pré-culture à 37 °C sous agitation pendant une nuit dans 10 mL de milieu contenant les antibiotiques. Les bactéries sont ensuite cultivées dans 500 mL de milieu avec antibiotiques, en mesurant régulièrement la densité optique. Quand une densité optique comprise entre 0,6 et 0,8 est atteinte, la production de protéines est induite avec 1 μM d'IPTG, à 25°C pendant trois heures. Les bactéries sont finalement centrifugées pour retirer le surnageant et le culot est congelé à -80°C.

2.3. Purification

Pour purifier RanQ69L nous nous sommes servis du Tag histidine (6xHis-Tag) porté par la protéine. La purification se fait dans une solution tampon (PBS, NaCl 150 mM, MgCl_2 2mM, glycérol 10%) avec plus ou moins d'imidazole : Ran35 : 35 mM imidazole, Ran300 : 300 mM imidazole.

Les bactéries sont lysées pendant 30 minutes dans du tampon Ran35 avec 1 mg de lysozyme, 1 mM d'AEBSF et des inhibiteurs de protéases pour protéger la protéine. La solution de bactéries est ensuite soniquée, puis centrifugée 30 minutes à 10000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré, déposé sur 500 μL de billes Ni-NTA-sépharose et laissé sous agitation pendant 2h à 4°C. La protéine s'accroche aux ions Ni^{2+} portés par les billes via son 6xHis-Tag.

Les billes couplées au RanQ69L sont ensuite rincées trois fois avec Ran 35, 1 mM d'AEBSF et des inhibiteurs de protéases puis placées dans une colonne de chromatographie. La protéine est éluée avec du tampon Ran 300. L'imidazole a une affinité pour les ions Ni^{2+} plus grande que la protéine, ce qui permet de la détacher des billes. Cinq ou six fractions de 500 μL sont récupérées. La concentration en protéines est mesurée avec un gel dénaturant SDS-Page (Life technologies). Les trois fractions les plus concentrées et les plus pures sont regroupées (généralement les fractions 2, 3 et 4).

De l'EDTA et du DTT sont ajoutés à une concentration finale de 5 mM et 1 mM respectivement, ainsi que du GTP à raison de 100 fois la concentration de RanQ69L.

Après quarante minutes d'incubation dans la glace, 50 mM de MgCl_2 sont ajoutés. La protéine est ensuite dialysée une nuit dans du tampon XB1 (HEPES 10 mM, MgCl_2 1 mM, KCl 100mM, sucrose 50 mM)

Après une seconde dialyse de deux heures, un dosage Bradford nous donne la concentration de RanQ69L. Du GTP est ajouté à raison de trente à cent fois la concentration de RanQ69L et on reconcentre éventuellement la protéine dans des tubes Vivaspin. La protéine est ensuite congelée à -80 °C avec 8% de glycérol.

3. Greffage de molécules sur les nanoparticules

3.1. Greffage du RanQ69L

Nous avons greffé du RanQ69L à la surface des nanoparticules NanoCs et Ademtech. La stœchiométrie initiale est comprise entre 0 et 1500 protéines par nanoparticule. Le couplage se fait par chélation *via* un 6xHIS-Tag porté par RanQ69L et des ions Ni^{2+} (Figure 37). Le couplage se fait dans la glace pendant trente minutes dans du tampon XB1 avec du NiCl_2 à 2 mM, les nanoparticules sont ensuite rincées avec du tampon XB1. Nous avons choisi ce mode de couplage pour sa simplicité et car il nous permet un bon contrôle de la stœchiométrie. Le principal désavantage est la non-covalence du couplage qui conduit à un temps de vie faible (de l'ordre de quelques heures^o).

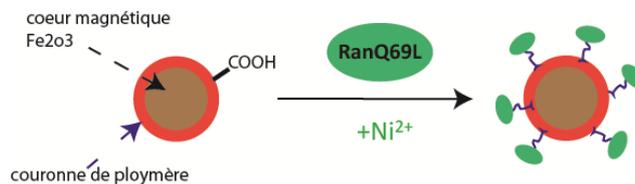


Figure 37 La protéine RanQ69L est couplée aux acides carboxyliques de la nanoparticule via un 6HisTag et un ion Ni^{2+} .

3.2. Greffage du PEG-PLL fluorescent

Pour rendre les nanoparticules fluorescentes il est possible de leur greffer du PEG-PLL (Sisko, 1g.L^{-1} initialement) couplé avec de l'Alexa-NHS fluorescent (568, Life Technologies, $12\ \mu\text{M}$ initialement). Le PEG-PLL est tout d'abord mis en présence de l'Alexa-NHS à température ambiante pendant trente minutes en milieu basique. Le groupement NHS de l'Alexa va se lier aux amines de la polylysine.

Le PEG-PLL-Alexa est ensuite mis en présence des nanoparticules à température ambiante pendant 30 minutes. L'excédent de PEG-PLL-Alexa est enfin rincé avec du tampon XB1.

3.3. Greffage de l'Epidermal Growth Factor

Nous avons couplé l'Epidermal Growth Factor (protéine recombinante humaine porteuse d'un tag histidine, Cliniscience, stœchiométrie initiale 2000 protéines par particule) aux nanoparticules. L'EGF est rendu fluorescent, de la même manière que pour le PEG-PLL (couplage avec de l'Alexa 568 pendant trente minutes à température ambiante, en présence de NaHCO_3), puis couplé aux nanoparticules par chélation (trente minutes dans la glace), avec la même stratégie que pour le RanQ69L.

3.4. Greffage à la surface des nanoparticules de diamètre supérieur à 100 nm

Pour les nanoparticules de diamètre supérieur à 100 nm, il est possible de rincer l'excédent de molécules non couplées par tri magnétique. Un aimant est approché du tube, les nanoparticules se

regroupent contre la paroi du tube en quelques minutes et peuvent ainsi être rincées avec du tampon XB1.

3.5. Greffage a la surface des nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nm

Les nanoparticules de 30 nm de diamètre ne peuvent pas être rincées par tri magnétique. Elles sont donc rincées par plusieurs cycles de centrifugation (13000 rpm) / rinçages dans du tampon XB1.

4. Dispositif de microscopie

La microscopie de fluorescence a été effectuée sur un microscope Olympus inversé IX-81. Nous avons utilisé en général un objectif 60X à huile (PlanApo, ON : 1,42). Pour les expériences avec des aimants nous avons utilisé des objectifs à eau (LUMPlanFLN, O N : 1 ; UPLSAPO, NA : 1,2) nous permettant d'avoir une distance de travail plus importante que pour des objectifs à huile et de ne pas placer les éléments trop près des objectifs, qui contiennent des pièces polaires.

La microscopie confocale a été effectuée sur un microscope Zeiss LSM 710 META avec un objectif x63 (PlanApochromatic, ON : 1,4).

5. Extrait cellulaire de Xénope

5.1. Le *Xenopus laevis*

Le *Xenopus laevis*, aussi appelé Xénope est une grenouille originaire d'Afrique du Sud.

La Xénope est un modèle animal très utilisée en biologie pour étudier par exemple le développement embryonnaire ou le cycle cellulaire^{124, 125}.



Figure 38 Femelle Xénope

Les femelles pondent des œufs polarisés de 1 à 1,3 mm de diamètre qui présentent un hémisphère animal pigmenté noir, contenant le noyau, et un hémisphère végétatif dépigmenté blanc contenant le cytoplasme.



Figure 39 Oeufs de Xénope. Tiré de www.xenopus.com.

Dans cette thèse nous avons utilisé des extraits cellulaires d'ovocytes de Xénope. Ces extraits cellulaires permettent de travailler dans un environnement sans membrane, dans lequel des protéines de régulations ou des drogues peuvent être facilement enlevées ou ajoutées.

5.2. Préparation des extraits cellulaires de Xénope

Les extraits ont été préparés en suivant les protocoles décrits par Desai *et al.*, Hannak *et al.* et Field *et al.*¹²⁶⁻¹²⁸.

5.2.1. Déclenchement de la ponte

Il faut induire la ponte des Xénopes avec des injections de 500 U.I de gonadotropine trois à dix jours avant le jour de la préparation d'extrait. La veille au soir les grenouilles sont injectées avec de la HCG. Les Xénopes sont placées dans des bacs séparés, elles pondent dans la nuit et il faut récupérer les œufs 16 à 18h après l'injection. Les œufs des différentes Xénopes ne sont pas mélangés car la qualité est très variable d'une grenouille à l'autre (la qualité dépend par exemple beaucoup de l'état de stress de la Xénope au moment des injections).

5.2.2. Rinçage et dégangage

Les œufs sont ensuite rincés avec une solution de NaCl (110mM), puis avec un tampon XB-CSF (HEPES, 10 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 5 mM, Sucrose 100 mM, pH = 7,5) jusqu'à élimination des différents déchets et débris.

De la cystéine est ajoutée à 2% (Tampon XB-CSF + 2% cystéine pH =7,8) pendant un temps qui varie de une minute trente secondes à deux minutes suivant le nombre d'œufs. La cystéine fluidifie le mucus qui recouvre les œufs de Xénope. Il ne faut pas la laisser trop longtemps au contact des œufs pour éviter leur activation (Figure 40). Les œufs sont ensuite rincés plusieurs fois avec une solution de NaCl (110 mM) puis avec le tampon XB-CSF et enfin avec une solution XB-CSF à 2 μ M de DTT.



Figure 40 Oeufs de Xénope avant (gauche) et après (droite) le traitement à la cystéine.

En fonction des extraits souhaités, polymérisant ou non l'actine, le protocole sera maintenant différent. Dans la suite on appellera *extrait microtubule* les extraits utilisés pour polymériser uniquement les microtubules et *extrait actine* ceux utilisés pour polymériser les filaments d'actine en plus des microtubules.

Extrait microtubule : Des inhibiteurs de protéase et de la cytochalasine-D, qui va dépolymériser l'actine, sont rajoutés à ce stade

Extrait actine : Seuls les inhibiteurs de protéase sont ajoutés, et les extraits sont placés dans la glace le plus vite possible pour ralentir la contraction de l'actine.

5.2.3. Centrifugation

Extrait microtubule : toutes les étapes de centrifugation se font à 16 °C.

Extrait actine : toutes les étapes de centrifugation se font à 4 °C.

Une première centrifugation lente (150 g, 1min) permet de sédimenter les œufs et de retirer l'excès de tampon (Figure 41).



Figure 41 Œufs après la première centrifugation.

Une centrifugation rapide est ensuite effectuée (1000 g, 10min). A la fin de cette centrifugation, trois phases peuvent être observées, une première phase jaune qui contient des lipides, la phase du milieu qui contient les principaux éléments du cytosquelette et les protéines de régulation ; et le culot qui contient la chromatine, différentes organelles et la membrane des œufs. Pour les extraits actine on peut parfois avoir quatre phases, à cause de la contraction de l'actine. Il faut alors prendre la phase la plus foncée, juste au-dessus du culot (Figure 42).

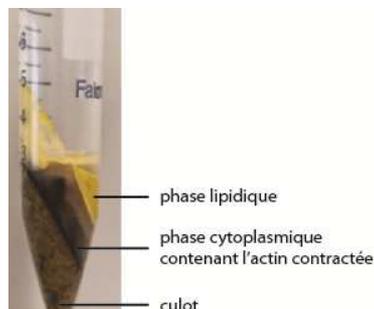


Figure 42 Résultat de la première centrifugation rapide pour les extraits d'actine

Après cette étape, on ajoute des inhibiteurs de protéase (et de la cytochalasine-D pour les extraits microtubule) aux mêmes concentrations que précédemment. Une dernière centrifugation rapide est effectuée pour purifier l'extrait. La phase cytoplasmique est récupérée et aliquotée avant de la congeler dans l'azote liquide. Les extraits peuvent se conserver plusieurs années à -80°C . Ces extraits sont bloqués en métaphase-II. Ils ne contiennent plus de chromatine, les chromosomes ayant été supprimés après les cycles de centrifugation.

5.3. Polymérisation des microtubules et assemblage des asters

5.3.1. Tubuline fluorescente

Pour visualiser les microtubules, de la tubuline fluorescente marquée par une Rhodamine (Cytoskeleton) est ajoutée à l'extrait cellulaire.

5.3.2. Système régénérateur d'énergie

Un système régénérateur d'énergie est ajouté à l'extrait (1 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ creatine phosphokinase). Cela permet de conserver une forte concentration en ATP.

5.3.3. Nucléation et auto assemblage des microtubules.

La nucléation des microtubules peut être induite grâce à différentes molécules. Dans cette thèse nous avons travaillé avec du paclitaxel et la protéine RanQ69L.

Le paclitaxel est une drogue qui stabilise les microtubules en supprimant leur dynamique et donc en réduisant les catastrophes. A 100 nM, le paclitaxel permet la polymérisation des microtubules, qui sont ensuite organisés en asters par les dynéines (Figure 43).

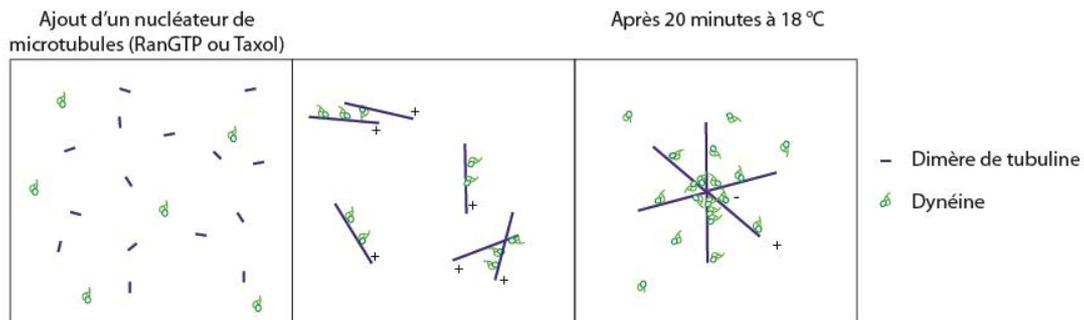


Figure 43 Polymérisation des microtubules et organisation de ceux-ci en aster par les moteurs dynéines.

La protéine RanQ69L, qui est un mutant de la protéine RanGTP bloqué dans la forme GTP, peut aussi être utilisée. Pour des concentrations supérieures à 4 μM , RanQ69L induit la formation d'asters dans les extraits. La protéine RanQ69L porte un 6His-tag et peut donc être couplée aux nanoparticules par chélation.

Pour former et observer des asters de la tubuline fluorescente et de l'ATP sont rajoutés à l'extrait. On ajoute ensuite du paclitaxel ou du RanQ69L puis l'extrait est incubé pendant 30 minutes entre 18 et 20°C. Dans tous les cas, l'extrait ne doit pas être dilué à plus de 80%.

5.3.4. Fixation des échantillons

La paraformaldéhyde (PFA) utilisée à 4 % final en volume, permet de fixer les échantillons qui peuvent ensuite être observés dans les 24 heures.

5.4. Polymérisation et observation des filaments d'actine

5.4.1. Observation de l'actine

Pour visualiser l'actine de l'utrophine-GFP (120 nM), ou de la phalloïdine (50 nM) fluorescente sont utilisées. Le réseau d'actine peut être observé immédiatement en microscopie de fluorescence.

5.4.2. Perturbation de l'actine

Plusieurs molécules permettent de perturber la polymérisation et le comportement dynamique de l'actine. Nous en avons utilisé deux : la cytochalasine-D et la blebbistatine. La cytochalasine-D permet la dépolymérisation de l'actine. Elle est utilisée à 2 µg/mL finale dans nos extraits. La blebbistatine va agir sur la myosin II et va donc ralentir la contraction des filaments d'actine. Elle est utilisée à 80 nM

5.5. Encapsulation des extraits

Il est possible d'encapsuler les extraits dans des gouttes de 20 à 200 µm de diamètre^{33, 129}. On utilise pour cela le copolymère à bloc P135 (PHS-PEO-PHS, Arcalel) dissout à 0,4 g.L⁻¹ dans de l'huile minérale. Pour dissoudre le P135 une première dilution intermédiaire à 1 g.L⁻¹ est effectuée, suivit de trois cycles de sonication (trente minutes)/vortex (une minute). Douze heures plus tard, une dilution à 0,4 g.L⁻¹ est effectuée suivit des trois cycles sonication/vortex.

Pour former des gouttes d'extrait cellulaire, on dépose une goutte de 1 µL d'extrait dans 100 µL de P135. La goutte d'extrait est cisailée avec une pipette, une émulsion est obtenue par activation mécanique. Les microtubules ou l'actine peuvent alors polymériser et s'auto-organiser dans les gouttes (Figure 44). Les microtubules s'auto-assemblent en asters, tandis que les microfilaments d'actine forment un anneau contractile.

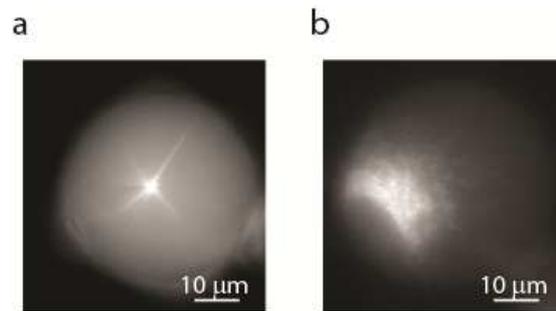


Figure 44 a, Aster de microtubules confiné dans une goutte d'extrait cellulaire. b, Réseau d'actine confiné dans une goutte d'extrait cellulaire.

6. Gradient de nanoparticules magnétiques

6.1. Dispositif expérimental

Nous avons travaillé en extrait cellulaire de Xénope, confiné dans des gouttes dont le diamètre variait de 20 à 50 μm . Nous avons utilisé des nanoparticules magnétiques fluorescentes de 30 nm de diamètre. Le champ magnétique a été créé par un aimant permanent fer/néodyme (Supermagnete, 10x3x2 mm, Q-10-03-02-HN). Nous avons mesuré avec un gaussmètre un gradient de champ d'environ $100 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$. Les nanoparticules sont sensibles au champ magnétique créé par notre aimant à condition d'être très proches de celui-ci (à une distance inférieure à 500 μm). Pour faciliter l'observation, nous avons introduit les émulsions d'extrait de Xénope dans des capillaires de 50 μm de hauteur et 500 μm de largeur (VitroCom), permettant l'observation d'une monocouche de gouttes tout en restant très proche de l'aimant (Figure 45).

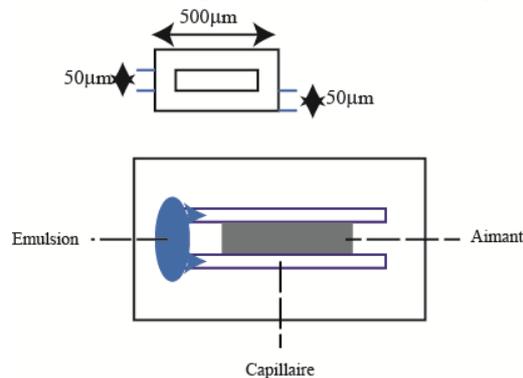


Figure 45 Deux capillaires rectangulaires sont placés contre un aimant permanent. L'émulsion d'extrait cellulaire est introduite dans les capillaires, les gouttes se retrouvent donc à une distance allant de 50 à 500 μm de l'aimant.

6.2. Détermination de la concentration des nanoparticules au sein des gouttes

L'intensité de fluorescence est le rapporteur du nombre de nanoparticules fluorescentes. Pour déterminer la concentration locale en nanoparticules, il faut prendre en compte la forme de la

goutte. En effet, en microscopie champ large, la fluorescence collectée correspondant à la fluorescence sur tout le volume de la goutte. La fluorescence est donc plus importante là où la goutte est la plus épaisse, même si la concentration en nanoparticules est homogène (Figure 46).

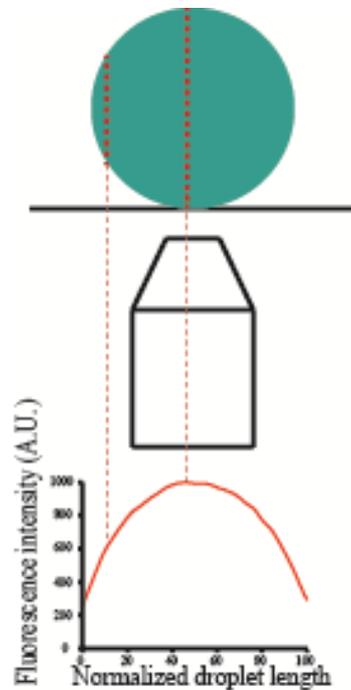


Figure 46 Schéma de l'observation d'une goutte en épifluorescence, le profil d'intensité dépend de la forme de la goutte.

Le profil d'intensité de fluorescence dépend donc de la forme de la goutte. La concentration en nanoparticules peut être obtenue en déconvoluant par la forme de la goutte. Pour cela, nous avons estimé la forme moyenne des gouttes dans nos capillaires avec douze gouttes ayant une concentration en nanoparticules homogènes (Figure 47, a, b).

Nous avons ensuite pondéré chaque profil d'intensité par la forme de la goutte. Le profil de fluorescence qu'aurait une goutte homogène (dont le profil moyen a été mesuré précédemment) de même intégrale est calculé et permet de déconvoluer la forme de la goutte (Figure 47, c, d).

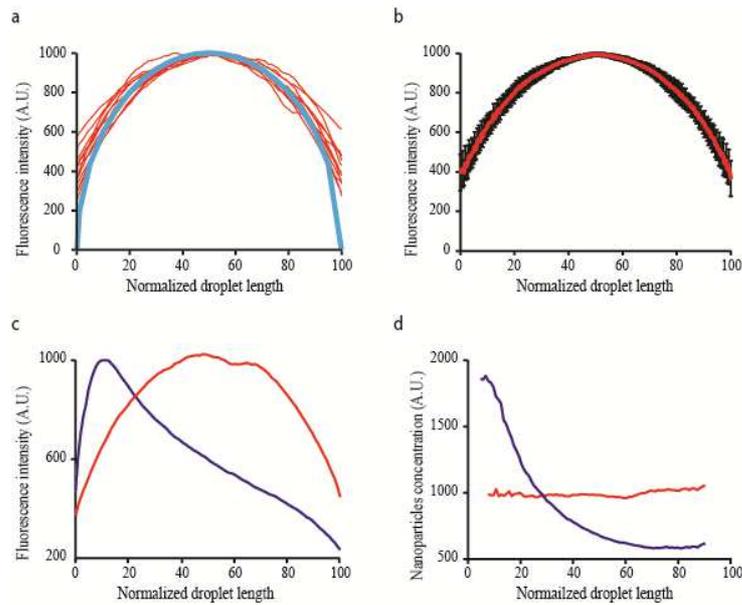


Figure 47 Détermination de la concentration de nanoparticules en utilisant les profils de fluorescences. a, rouge : profil de fluorescence de nanoparticules dispersées de manière homogène dans une goutte ($n=12$ gouttes), bleue : profil d'une goutte sphérique idéale. b, profil moyen des gouttes homogènes. c, Profil de fluorescence d'une goutte homogène (rouge) et d'une goutte asymétrique (bleue). d, résultat de la déconvolution.

7. Etude de la localisation d'endosomes magnétique dans des cellules HeLa

Pour les expériences en cellule nous avons travaillé avec des cellules HeLa.

Durant cette thèse nous avons endocyté par voie non spécifique des nanoparticules couplées à du PEG fluorescent et par voie spécifique des nanoparticules couplées à des protéines d'Epidermal Growth Factor (EGF) fluorescentes.

Plusieurs techniques existent pour internaliser des nanoparticules dans des cellules : elles peuvent être injectées, endocytées ou encore internalisées à l'aide de peptides. Ces différentes méthodes présentent des avantages et des inconvénients. La micro-injection, par exemple, est très utile pour injecter de grosses particules ($> 200 \mu\text{m}$) mais elle ne permet pas de paralléliser fortement les expériences. Pour notre étude nous avons choisi d'internaliser les nanoparticules par endocytose. L'endocytose est en général non spécifique, mais il est possible de la rendre spécifique en greffant sur les nanoparticules des ligands reconnus par des récepteurs en surface des cellules. Les nanoparticules endocytées se retrouvent dans des vésicules d'endocytose, les endosomes, ce qui représente une des limitations majeures pour nos expériences. Pour résoudre ce problème nous avons plusieurs possibilités. Il est d'abord possible de libérer les nanoparticules conjuguées piégées dans les endosomes en changeant la pression osmotique¹³⁰. Une méthode, plus directe et

que nous avons utilisée, consiste à étudier une cascade de signalisation dans laquelle le récepteur porte la signalisation et est internalisé avec le ligand. Dans ce cas la signalisation a lieu à la surface des endosomes et perdure jusqu'à la dégradation du récepteur. Dans le cas de l'EGF, c'est le récepteur EGFR qui porte la signalisation. Il est endocyté en même temps que les nanoparticules magnétiques bioconjuguées.

7.1. Endocytose de nanoparticules magnétiques

L'endocytose de nanoparticules a été très bien décrite. Elle va dépendre de la taille, la charge, le traitement de surface, la forme des nanoparticules ou encore du type de cellules utilisées¹³¹.

Les cellules sont étalées dans des boîtes Ibidi recouvertes de collagène (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pendant une heure, puis rinçage au PBS), pour permettre une bonne adhésion des cellules. Elles s'étalent pendant deux heures dans un milieu de culture complet (milieu DMEM + streptomycine + pénicilline + 10% FBS, GE Healthcare) à 37° C. Elles sont ensuite privées de sérum pendant une heure dans un milieu d'internalisation (milieu DMEM + streptomycine + pénicilline, sans FBS). Du milieu d'internalisation « froid » contenant les nanoparticules magnétiques est ensuite rajouté. Les cellules sont incubées vingt minutes à 4 °C. Les nanoparticules se collent à la surface des cellules (pour les nanoparticules couplées, l'EGF se lie à son récepteur EGFR). L'excès de nanoparticules est rincé avec du milieu d'internalisation « froid » (4°C) puis les cellules sont incubées quarante minutes à 4 °C. Elles sont ensuite rincées avec du milieu d'internalisation préchauffé puis placées à 37°C. Elles vont alors commencer à endocyter les nanoparticules.

7.2. Immunofluorescence : détection du récepteur EGFR

Pour suivre l'activation des récepteurs EGFR, nous avons utilisé des anticorps les reconnaissant. Les cellules sont tout d'abord rincées avec du PBS. Elles sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 4 % (vingt minutes à température ambiante), puis rincées à nouveau avec du PBS. La membrane des cellules est ensuite rendue perméable avec du Triton 0.5% pour permettre l'entrée des anticorps. L'anticorps anti-EGFR va reconnaître l'EGFR activé, un anticorps secondaire va permettre de faire le marquage fluorescent. Chaque anticorps est incubé pendant cinq minutes avec les cellules, puis rincé avec du PBS.

7.3. Pointe magnétique

Les nanoparticules magnétiques que nous utilisons sont des objets superparamagnétiques qui, lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, ressentent une force du type :

$\mu_{x,i} \frac{dB_x}{dx}$, où B_x est le champ magnétique dans la direction x et $\mu_{x,i}$ le moment magnétique.

C'est donc le gradient de champ magnétique qui importe pour nos expériences. Pour avoir un meilleur contrôle de ce gradient, nous avons travaillé avec des pointes magnétiques. La pointe magnétique est faite avec un fil de Nickel (70%)/Fer (30%) de 30 μm (Goodfellow). Nous avons étiré ce fil en forme de pointe. (Figure 48). Ces pointes sont ensuite magnétisées sur un aimant

permanent cubique (3x3x3 mm, Supermagnete). Ce dispositif permet d'augmenter et de localiser fortement le gradient de champ magnétique^{121, 132}.

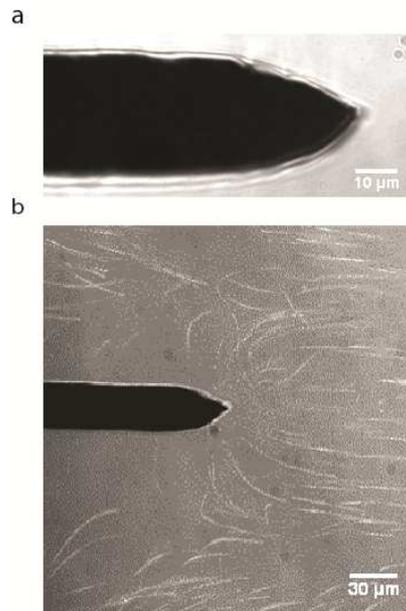


Figure 48 Pointe magnétique. a, Fil de nickel et de fer, étiré en pointe. b, Trajectoires de nanoparticules magnétiques (120nm de diamètre) fluorescentes attirées par la pointe magnétique.

7.4. Perturbation du cytosquelette

La cytochalasine-D nous a permis de perturber le réseau d'actine. La cytochalasine-D est une molécule perméante qui perturbe la polymérisation des filaments d'actine en se liant à leur bout barbé et en empêchant l'ajout de nouveaux monomères, alors que la dépolymérisation de l'actine a toujours lieu au bout pointu.

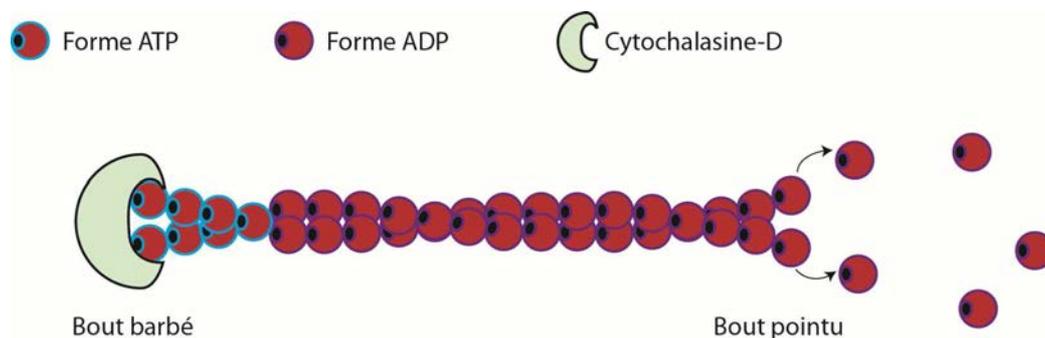


Figure 49 Mécanisme d'action de la cytochalasine-D

Pour perturber les microtubules, nous avons utilisé le nocodazole, une molécule qui déstabilise les microtubules en séquestrant les monomères de β -tubuline.

Matériels et méthodes

Chapitre 3 Contrôler un gradient de protéines de signalisation avec des nanoparticules magnétiques

1. Motivations.....	58
2. Gradient de nanoparticules magnétiques	60
2.1. Forces mises en jeu.....	60
2.2. Effet de la taille des nanoparticules et contrôle diffusionnel.....	61
2.3. Gradient de nanoparticules magnétiques	62
2.3.1. Simulation du mouvement de nanoparticules dans un champ magnétique.....	62
2.3.2. Etablissement d'un gradient de nanoparticules	65
2.3.3. Caractérisation expérimentale du gradient.....	67
3. Gradient de protéines contrôlé par un champ magnétique	70
3.1. Assemblage d'un aster de microtubules.....	70
3.2. Couplage de RanGTP avec des nanoparticules magnétiques	71
3.2.1. Stratégie de couplage	71
3.2.2. Caractérisation du couplage	71
3.2.3. Fonctionnalité du couplage	72
3.3. Génération d'un gradient de RanGTP dans un environnement confiné	73
3.3.1. Effet des nanoparticules en l'absence de champ magnétique : distribution homogène de RanGTP	73
3.3.2. Perturber la position des asters avec un gradient de RanGTP.....	73
4. Discussion.....	77
4.1. Éléments en présence.....	77
4.1.1. Microtubules.....	77
4.1.2. Gouttes d'extrait cellulaire	77
4.1.3. Gradient de RanGTP.....	77
4.1.3.1. Effet d'un gradient de TPX2 (gradient de nucléation) sur les asters	78
4.1.3.2. Effet d'un gradient de CDK11 (gradient de stabilisation) sur les asters	80
4.1.4. Moteurs moléculaires : dynéines.....	81
4.2. Mécanisme 1 : délocalisation des asters induite par des forces de polymérisation ...	82
4.3. Hypothèse 2 : forces de traction due aux moteurs moléculaires.....	84
4.3.1. Dépendance entre la force de traction et la longueur des microtubules.....	84
4.3.2. Distribution des dynéines dans la goutte	85
4.4. Conclusion.....	86

1. Motivations

Des gradients de concentration de protéines ont été observés dans les cellules (voir Chap. 1)^{50, 133, 134}. Ces gradients peuvent se révéler importants pour l'organisation intracellulaire. Malgré le grand nombre d'études théoriques⁴⁵, très peu de méthodes sont disponibles pour étudier expérimentalement les gradients de protéines de signalisation. La microfluidique ne permet généralement que de créer des gradients extracellulaires. Une extension de cette approche pour générer des gradients intracellulaires consiste à utiliser des gradients de molécules perméantes à la cellule¹³⁵. L'optogénétique peut se révéler intéressante pour localiser fortement dans l'espace une activité protéique. Ainsi Lim et al. ont réalisé un système réversible d'activation protéique basé sur l'utilisation de sources lumineuses (activation/inhibition) pour imposer une forte localisation spatiale à une protéine⁸⁷. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas à ce jour de méthodes pour générer et contrôler directement un gradient de protéines de signalisation dans un espace intracellulaire

Les approches basées sur la manipulation de nanoparticules ont permis de déclencher une voie de signalisation, avec un signal fortement localisé, sur une bille magnétique ou un agrégat de nanoparticules, mais pas de générer un signal avec une extension spatiale importante^{121, 122}. Nous avons étendu cette méthode pour créer artificiellement des gradients de protéines (Figure 50).

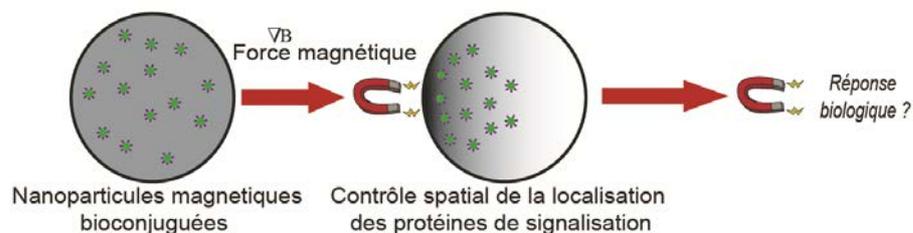


Figure 50 Principe général. Des nanoparticules magnétiques, bioconjuguées et confinées dans des gouttes d'extrait cellulaire sont soumises à un champ magnétique. Un gradient de nanoparticules et donc de protéines se forme sous certaines conditions.

Nous avons appliqué cette méthode à la protéine RanGTP qui est impliquée dans la formation du fuseau mitotique et forme au sein des cellules un gradient autour des chromosomes (Figure 51). Nous avons travaillé en extrait cellulaire de Xénope confiné dans des gouttes, ce qui est une première étape vers un travail intracellulaire (voir Méthodes, chap. 2).

Gradient de protéines de signalisation

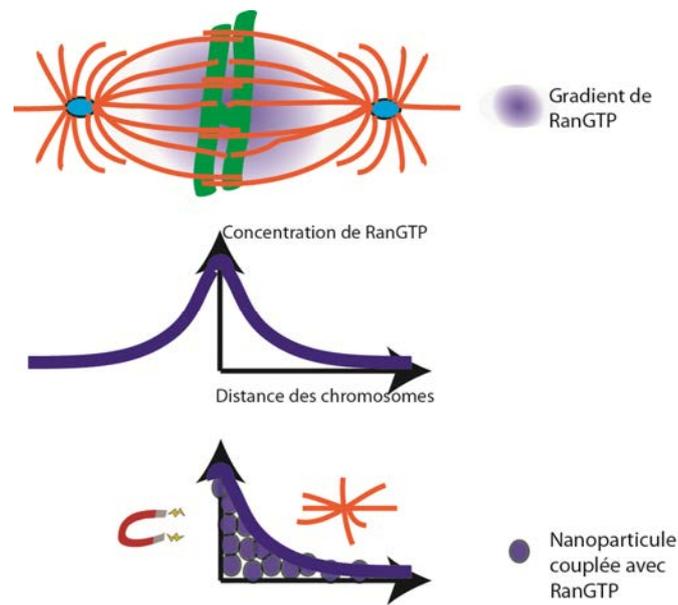


Figure 51 Lors de l'auto-organisation du fuseau mitotique un gradient de RanGTP se forme autour des chromosomes. Nous avons greffé RanGTP à des nanoparticules magnétiques pour recréer in vitro ce gradient dans des gouttes d'extraits cellulaires.

Après avoir examiné les paramètres physiques permettant l'établissement d'un gradient de nanoparticules magnétiques, nous examinerons la fonctionnalisation des nanoparticules magnétiques avec RanGTP, et enfin nous étudierons l'effet d'un gradient de RanGTP sur les microtubules.

Ce projet a donné lieu à une publication dans le journal *Nano Letters*¹³⁶.

2. Gradient de nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques soumises à un champ magnétique répondent à celui-ci en s'organisant en différentes structures dépendant de la nature des particules, de la géométrie du champ magnétique ou du milieu dans lequel elles sont placées.

Par exemple, il est possible de former des chaînes de nanoparticules, des colonnes, ou encore des structures en « labyrinthe »¹³⁷ (Figure 52).

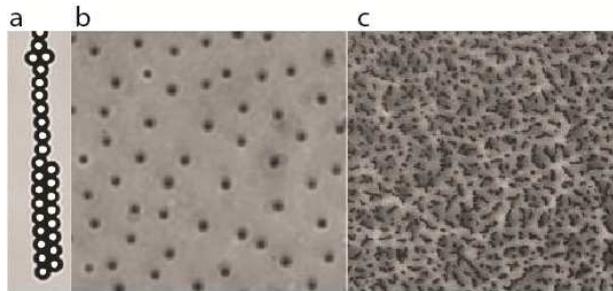


Figure 52 Différentes structures de nanoparticules magnétiques. a, Chaîne de nanoparticules magnétiques¹³⁷. b, Colonnes de nanoparticules magnétiques¹³⁷. c, « Labyrinthe » de nanoparticules magnétiques¹³⁷.

Cependant les gradients de concentration de nanoparticules ont été assez peu étudiés. Dans cette section nous allons examiner les paramètres permettant d'obtenir un gradient de nanoparticules magnétiques utilisable dans nos systèmes biologiques.

2.1. Forces mises en jeu

Considérons des nanoparticules superparamagnétiques diffusant dans un milieu liquide et soumises à un champ magnétique.

Les principales forces s'appliquant sur les nanoparticules sont¹³⁸:

-la force magnétique : $\mu_{x,i} \frac{dBx}{dx}$, où Bx est le champ magnétique dans la direction x , $\mu_{x,i}$ le moment magnétique et x la position de la particule i

-l'interaction dipolaire : $F_{ij} = \frac{3\mu_0 \mu_{i,x} \mu_{j,x}}{2 \cdot \pi \cdot (x_i - x_j)^4}$, où μ_0 est la susceptibilité magnétique du vide

-la force hydrodynamique : $-\gamma \cdot \frac{dx}{dt}$ avec $\gamma = 6\pi\eta a$ avec η la viscosité du milieu et a le rayon de la particule.

-le mouvement brownien qui va disperser les particules et contrer leur agrégation.

Pour deux particules proches l'une de l'autre, l'interaction dipolaire va prédominer.

2.2. Effet de la taille des nanoparticules et contrôle diffusionnel

Les nanoparticules superparamagnétiques sont donc sensibles à la fois au gradient de champ magnétique et au mouvement brownien. Un équilibre entre ces deux forces opposées est requis pour créer un gradient de nanoparticules^{138, 139}. Ainsi des nanoparticules de diamètre trop grand ne vont pas être sensibles au mouvement brownien et *a contrario* des nanoparticules trop petites risquent de n'être qu'insuffisamment couplées au champ magnétique.

Pour confirmer ces intuitions nous pouvons comparer le ratio λ entre l'énergie magnétique d'interaction entre deux particules et l'énergie thermique, pour différentes tailles de nanoparticules¹⁴⁰.

$$\lambda = \frac{\pi\mu_0 a^3 \chi^2 H^2}{9k_B T}$$

μ_0 est la perméabilité magnétique du vide, a le rayon de la particule, χ sa susceptibilité magnétique, k_B la constante de Boltzmann, et T la température.

Si λ est supérieur à 1, les particules auront tendance à agréger (Figure 53).

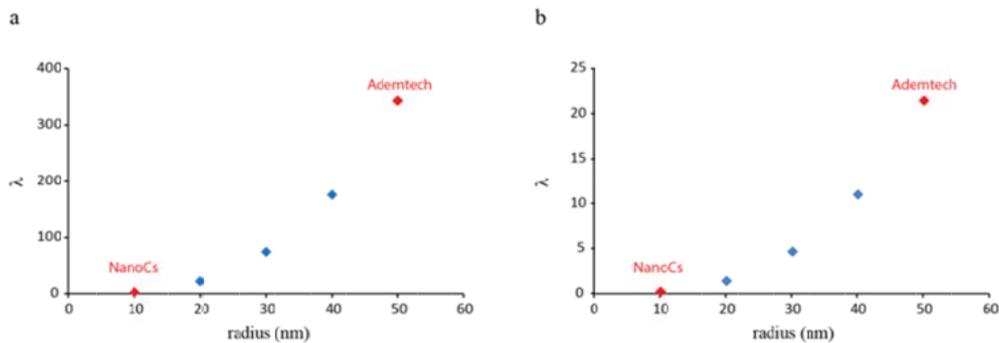


Figure 53 Valeur de λ pour des nanoparticules de différents rayons pour un champ magnétique de 400mT (a) et 100mT (b). Pour faire les calculs nous avons considéré que la susceptibilité des petites nanoparticules (NanoCs) est la même que celle des nanoparticules plus larges (Ademtech). Si le rayon de la particule est divisé par quatre, le ratio λ est divisé par 64.

Des nanoparticules de diamètre supérieur à 100 nm (Ademtech, voir Méthodes) soumises à un champ magnétique de 20 à 200 T.m⁻¹ s'agrègent systématiquement (Figure 54).

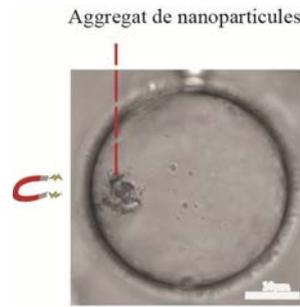


Figure 54 Nanoparticules magnétiques de 120 nm soumises à un champ magnétique de 50T.m^{-1} . Les particules s'agrègent sous champ.

Pour réduire le poids de l'interaction dipolaire et augmenter celui du mouvement brownien, nous avons travaillé avec des nanoparticules de diamètre plus petit. Notre choix s'est porté sur des nanoparticules magnétiques fluorescentes de 30 nm de diamètre (NanoCs).

2.3. Gradient de nanoparticules magnétiques

2.3.1. Simulation du mouvement de nanoparticules dans un champ magnétique

Pour nous aider à isoler les paramètres permettant l'établissement d'un gradient de nanoparticules magnétiques, nous avons réalisé une simulation. Nous nous sommes basés sur les travaux de Schaller *et al.* qui ont simulé le mouvement de nanoparticules magnétiques de quelques dizaines de nanomètres dans un champ magnétique¹³⁸. Pour la simulation nous avons pris une « goutte carrée » de côté L_g , placée à une distance L_c de l'aimant. Les nanoparticules sont dans la goutte, à une abscisse comprise entre $X=0$ et $X=L_g$. L'aimant se trouve en $X=L_g+L_c$ (Figure 55).

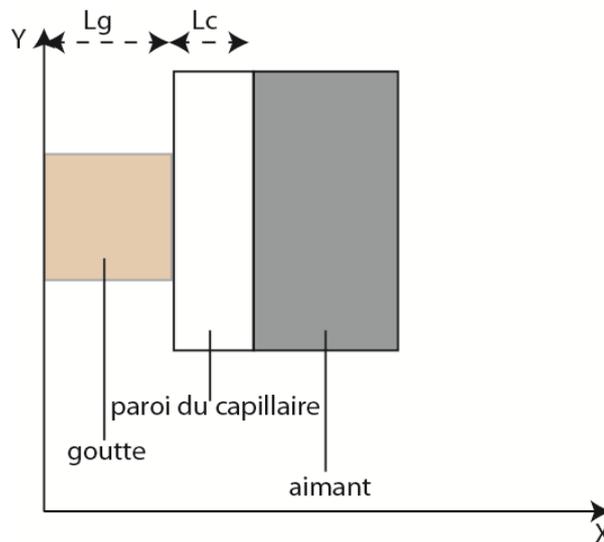


Figure 55 Géométrie utilisée pour les simulations. L'aimant est placé à une distance L_c de la goutte de diamètre L_g .

Gradient de protéines de signalisation

Comme vu précédemment, nous considérons la force magnétique F_m , la force hydrodynamique F_v , l'interaction dipôle-dipôle F_{ij} , et le mouvement brownien F_B .

$$F_m = \mu_x \cdot i \frac{dBx}{dx}, \text{ avec } \mu_x, i(B) = \frac{nd \cdot M_s \cdot V_d \cdot L \cdot (M_s \cdot V_d \cdot Bx)}{k_B T}, L(x) = \coth(x) - \frac{1}{x}$$

n_d est le nombre de microdomaines de la nanoparticule, M_s son aimantation, V_d son volume, x sa position, Bx la valeur du champ au point x .

Pour nos aimants $B(x) = \frac{Br}{\mu_0} \left[\arctan\left(\frac{Lm^2}{2x\sqrt{4(d)^2+2(d)^2}}\right) - \arctan\left(\frac{Lm^2}{2(L+d)\sqrt{4(L+d)^2+2L^2}}\right) \right]$, Lm est le côté de l'aimant = 5 mm et $d = Lc + Lg - x$, la distance de la particule à l'aimant^{141, 142}.

$$F_v = -\gamma \cdot \frac{dx}{dt}, \gamma = 6\pi\eta a, a = 30 \text{ nm}, \eta = 20 \text{ mPa} \cdot \text{s}^{-1} \text{ pour les extraits de Xénope}^{143}.$$

$F_{ij} = \frac{3\mu_0 \cdot \mu_{x,i} \mu_{x,j}}{2 \cdot \pi \cdot (x_i - x_j)^4}$, pour chaque particule i il faut sommer tous les F_{ij} correspondant à chaque particule j .

Equation du mouvement: $m\ddot{x} = \mu_x \frac{dBx}{dx} - \gamma\dot{x} + F_B + \frac{1}{\gamma} \sum_j F_{ij}$

À petit nombre de Reynolds, les effets inertiels peuvent être négligés:

$$\gamma\dot{x} = \mu_x \frac{dBx}{dx} + F_B + \frac{1}{\gamma} \sum_j F_{ij}$$

Au final : $x_i(t + \Delta t) = x_i(t) + \frac{1}{\gamma} F_m \Delta t + \Delta x^B + \left(\frac{1}{\gamma} \sum_j F_{ij}\right) \Delta t$

Où Δx^B représente le mouvement brownien, tel que variance $\langle (\Delta x^B)^2 \rangle = 2D\Delta t$, avec $D = k_B T / \gamma$

Simulation : Nous avons comparé l'influence de la concentration des nanoparticules sur leur attraction par le champ magnétique.

Dans notre simulation, $M_s = 3040 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ et $nd = 3$ (pour des particules de 50 nm Schaller *et al.* avaient $M_s = 304 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ et $nd = 3$)¹³⁹. Nous avons pris un pas $\Delta t = 1 \text{ ms}$, pour un temps total de 10 s, c'est-à-dire 10000 incréments.

Effet de la concentration des particules : nous avons étudié l'effet de la concentration des nanoparticules pour une goutte de diamètre $L_g = 80 \mu\text{m}$ et à une distance $L_c = 50 \mu\text{m}$ de l'aimant.

Gradient de protéines de signalisation

Nous avons d'abord tracé la trajectoire d'une nanoparticule seule, c'est-à-dire sans interaction dipôle-dipôle (Figure 56). Pour notre durée de simulation, la nanoparticule ne semble pas attirée dans la direction de l'aimant, seul un mouvement stochastique est observé.

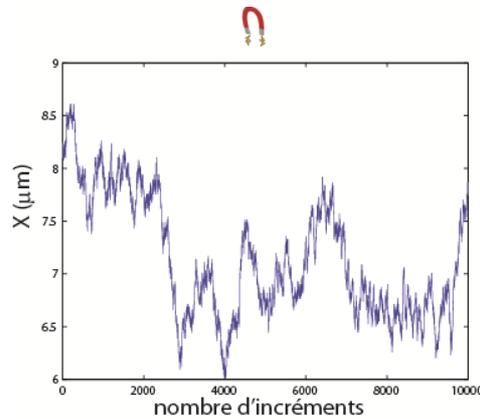


Figure 56 Trajectoire d'une particule seule dans un champ B.
L'aimant est situé à $x = Lc + Lg = 130\mu\text{m}$

Nous avons ensuite fait la même simulation pour une concentration croissante de nanoparticules magnétiques (Figure 57).

À $t = 0$ s, les nanoparticules sont aléatoirement distribuées dans la goutte, et après 10000 incréments (10 s) un certain nombre de nanoparticules a atteint le bord de la goutte. Pour 100, 500 et 1000 particules, 19 %, 68 % et 82 % des particules ont atteint le bord de la goutte à la fin de la simulation. Ces résultats montrent une influence de la concentration des nanoparticules et donc de leur interdistance, ce qui suggère que l'interaction dipôle-dipôle est prédominante dans cette configuration.

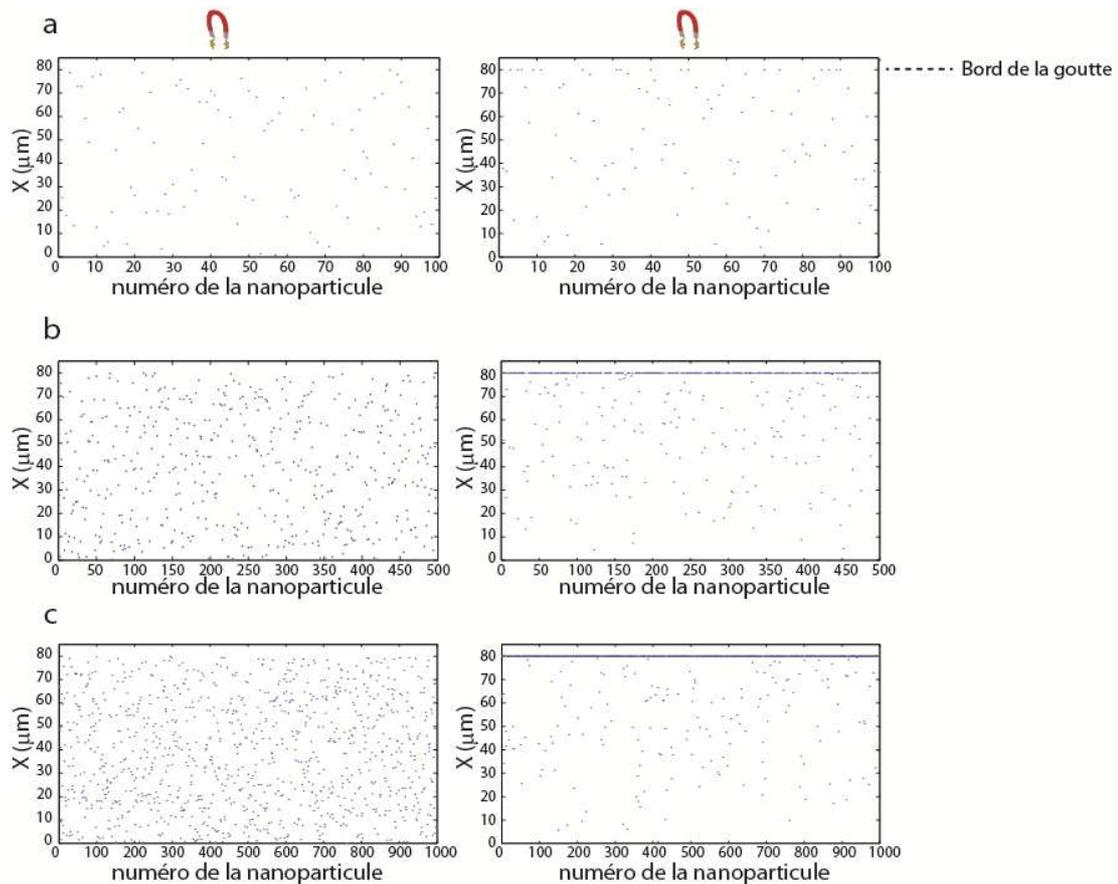


Figure 57 Simulation du mouvement des particules en fonction de leur concentration. Gauche : position en X initiale des nanoparticules, droite : position finale (t=10s). Le bord de la goutte est à X = 80 µm, l'aimant est à X = 130 µm. a, N=100 nanoparticules. b, N = 500 nanoparticules. c, N = 1000 nanoparticules.

Cette simulation a permis de mettre en lumière l'importance des interactions dipôle-dipôle, et donc l'importance de la concentration des nanoparticules pour nos expériences. En revanche, elle ne nous a pas permis d'extraire la valeur de concentration minimale nécessaire à la formation d'un gradient, que nous avons déterminée expérimentalement.

2.3.2. Etablissement d'un gradient de nanoparticules

Nous avons observé qu'une distance inférieure à 500 µm entre l'aimant (NeBd, environs 100 T.m⁻¹) et les nanoparticules était nécessaire pour attirer des nanoparticules superparamagnétiques de 30 nm. Nous avons donc mis au point un dispositif nous permettant de positionner un aimant permanent très proche (50 à 500 µm) de nos gouttes d'extrait cellulaire et de les observer (voir Méthodes, chap. 2).

Nous avons utilisé la fluorescence des nanoparticules magnétiques comme rapporteur de leur distribution spatiale dans les gouttes. Dans les gouttes proches de l'aimant nous avons observé

une forte sur-fluorescence du côté de l'aimant, révélatrice d'une accumulation de nanoparticules (Figure 58).

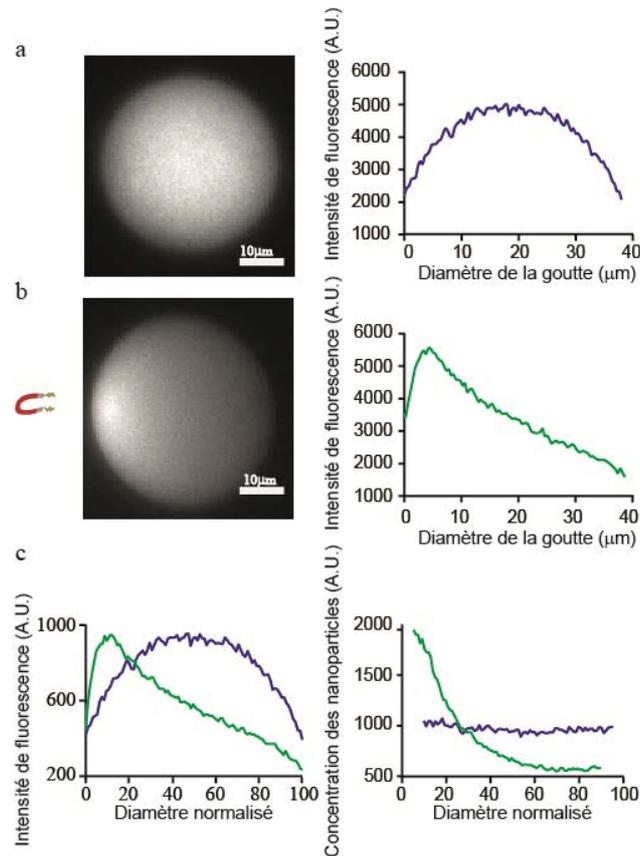


Figure 58 Gradient de concentration de nanoparticules magnétiques dans des gouttes d'extrait cellulaire. (a,b) Gauche: observation en microscopie de fluorescence de nanoparticules magnétiques dans des gouttes d'extrait cellulaire de Xénope en l'absence (a) et en présence (b) d'un champ magnétique. Droite: Profil d'intensité de fluorescence le long de la goutte. (c) Gauche: intensité de fluorescence pour la goutte homogène et la goutte asymétrique (bleue et vert respectivement), Droite: Concentration en nanoparticules correspondante.

Cette accumulation de nanoparticules est dépendante de la distance à l'aimant. Pour des distances inférieures à 100 μm, nous avons observé une très forte accumulation du côté de l'aimant (Figure 58, b). Pour des distances supérieures à 500 μm, nous n'avons pas observé d'accumulation de nanoparticules.

La migration des nanoparticules sous champ dépend également de la concentration en nanoparticules, certainement à cause des interactions dipôle-dipôle entre les nanoparticules^{115, 138}. Nous avons observé un seuil en concentration d'environ 40 nM.

Deux exemples de distribution de nanoparticules (distribution homogène et gradient) sont montrés sur la figure 58, c. À gauche nous avons représenté l'intensité de fluorescence le long de

Gradient de protéines de signalisation

la goutte, à droite nous avons déconvolué la forme de la goutte pour obtenir le gradient de concentration en nanoparticules (voir Méthodes). La longueur caractéristique de ce gradient est estimée à 20% du diamètre de la goutte c'est-à-dire une dizaine de micromètres.

Dans ces conditions nous obtenons un gradient de nanoparticules après environ 3 minutes.

2.3.3. Caractérisation expérimentale du gradient

Nous avons caractérisé la stabilité et la réversibilité du gradient. Pour cela, nous avons introduit des gouttes d'extrait contenant des nanoparticules magnétiques fluorescentes dans notre dispositif. Comme décrit précédemment, les gouttes proches de l'aimant présentent une surfluorescence révélatrice d'une accumulation de nanoparticules du côté de l'aimant. Nous avons suivi l'évolution de la fluorescence en fonction du temps pendant deux heures. Malgré une diminution de la fluorescence due au photo-blanchiment, le gradient de fluorescence, donc le gradient de nanoparticules reste stable (Figure 59). Le gradient est donc stable pendant au moins deux heures.

Gradient de protéines de signalisation

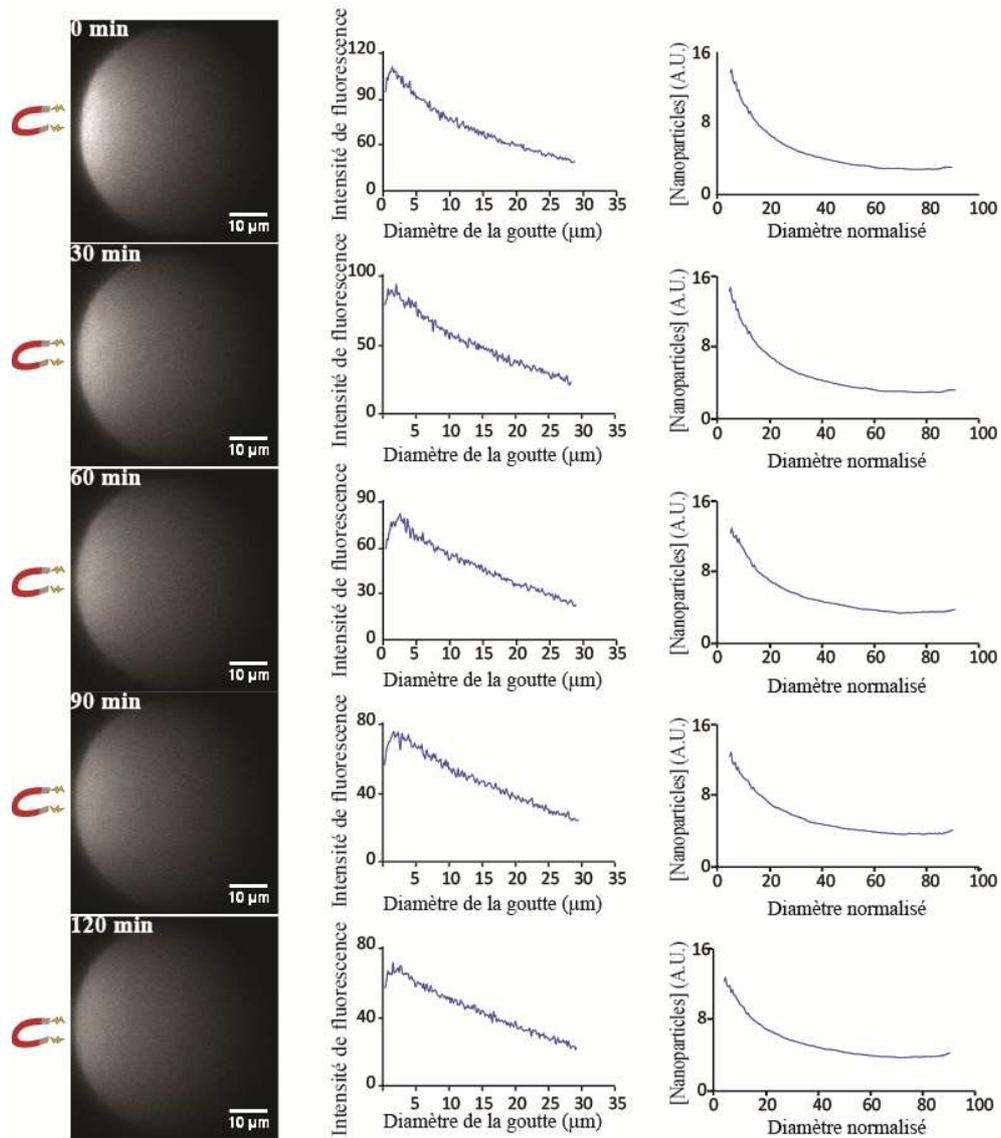


Figure 59 Stabilité temporelle du gradient de nanoparticules. Gauche : observation par microscopie de fluorescence du gradient de nanoparticules. Milieu : profil d'intensité de fluorescence le long de la goutte. Droite : concentration en nanoparticules correspondantes.

Gradient de protéines de signalisation

Nous avons ensuite observé que le gradient était réversible : quand l'aimant est retiré la fluorescence redevient homogène en moins d'une minute (Figure 60). En absence de champ magnétique, le mouvement brownien des particules est donc suffisant pour obtenir un environnement homogène en quelques secondes.

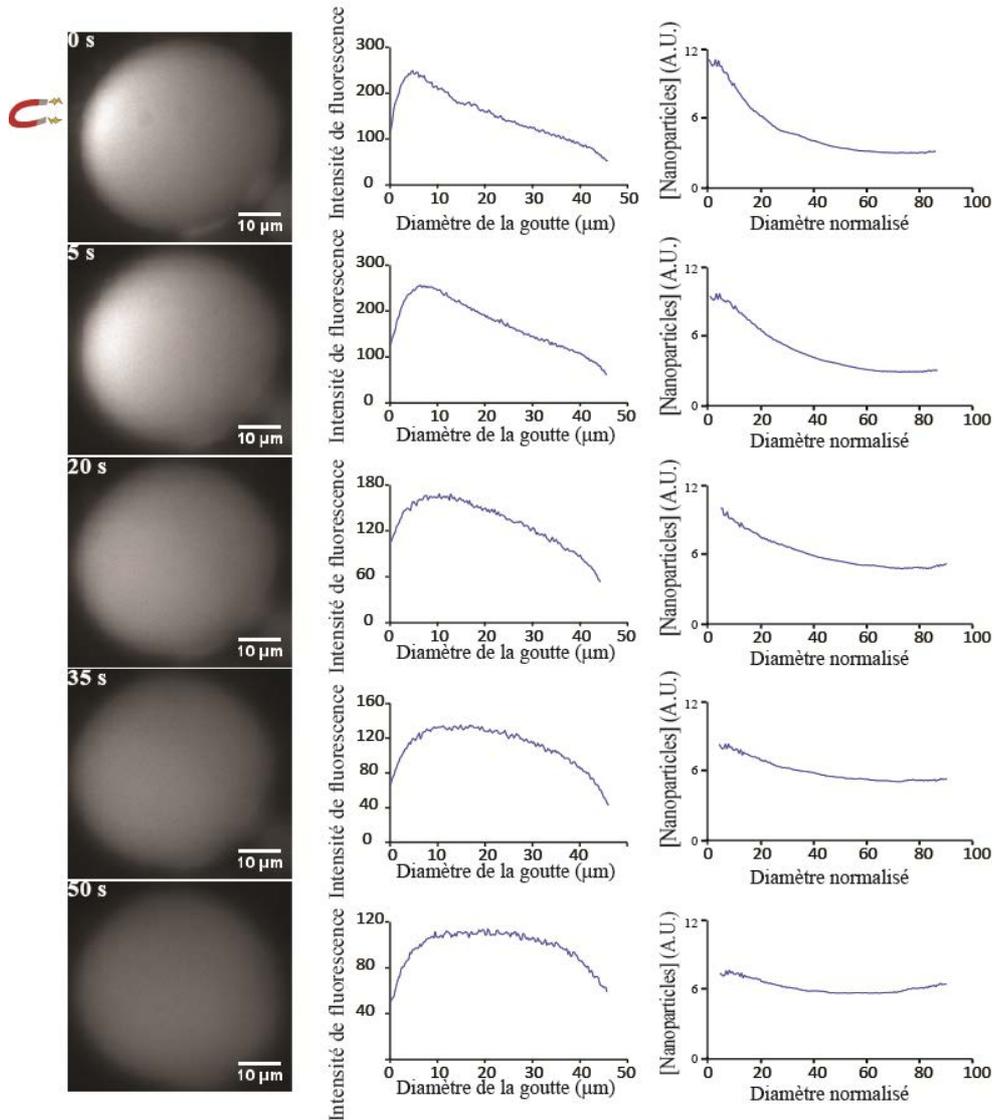


Figure 60 Réversibilité du gradient. Le champ magnétique est retiré à $t = 0$ s. Gauche : observation par microscopie de fluorescence de la distribution des nanoparticules, sous champ ($t=0$ s) ou après avoir retiré l'aimant. Milieu : profil d'intensité de fluorescence le long de la goutte. Droite : concentrations de nanoparticules correspondantes.

Nous avons montré dans cette section qu'il était possible de former un gradient de nanoparticules avec un champ magnétique, à condition d'avoir un nombre suffisant de nanoparticules et d'être très proche de l'aimant.

3. Gradient de protéines contrôlé par un champ magnétique

3.1. Assemblage d'un aster de microtubules

Nous avons travaillé avec RanQ69L, un mutant de Ran bloqué dans sa forme GTP active⁵². RanQ69L induit la polymérisation de microtubules dans des extraits cellulaires de Xénope avec un seuil de 4 μM (Figure 61).

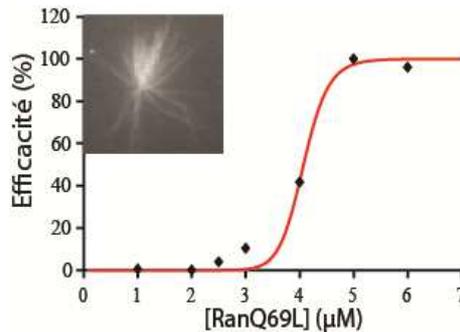


Figure 61 Seuil de formation des asters en fonction de la concentration de RanQ69L

Les interactions entre moteurs moléculaires multimériques et les microtubules conduisent à la formation de structures radiales appelées asters⁶³ (Chap. 1 et 2). En géométrie confinée, une distribution homogène de RanQ69L au-dessus du seuil de nucléation conduit à la polymérisation de microtubules, qui vont être organisés en aster par les moteurs moléculaires. Ce processus prend une vingtaine de minutes.

Dans la suite nous avons examiné l'influence d'un gradient de RanQ69L sur l'assemblage des asters (Figure 62).

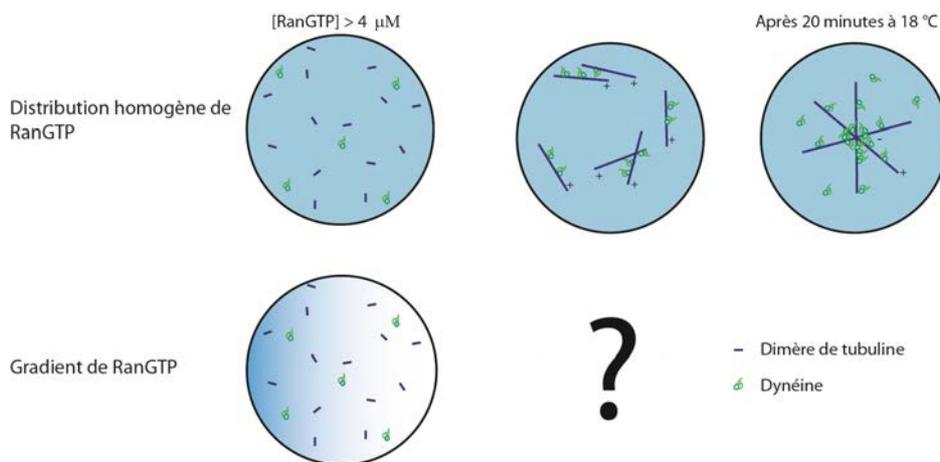


Figure 62 Principe de l'expérience. RanGTP induit la polymérisation de microtubules en milieu confiné. Sous l'action de dynéines, ces microtubules s'auto-assemblent en aster. Nous avons voulu examiner l'influence d'un gradient de RanGTP sur l'assemblage des asters.

3.2. Couplage de RanGTP avec des nanoparticules magnétiques

3.2.1. Stratégie de couplage

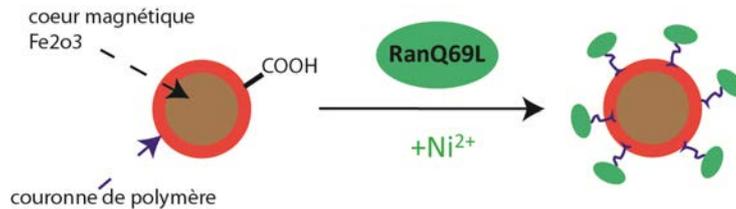


Figure 63 La protéine RanQ69L est couplée aux acides carboxyliques de la nanoparticule via un tag histidine et un ion Ni²⁺

La protéine recombinante purifiée a été couplée aux nanoparticules (Ran-NP). La protéine RanQ69L porte un tag histidine en position N-Terminal. Les nanoparticules sont recouvertes d'un film de polymère qui porte des acides carboxyliques. Le groupement histidine porté par la protéine peut être couplé aux acides carboxyliques via un ion Ni²⁺ (Figure 63).

3.2.2. Caractérisation du couplage

Nous avons caractérisé la stoechiométrie et la stabilité du couplage. Nous avons fait varier le ratio initial protéines/nanoparticules de 0 à 1500 protéines par particule. La concentration en protéines avant et après avoir rincé le couplage Ran-NP a ensuite été mesurée avec un gel SDS-Page. Le ratio protéines/nanoparticules final varie de 0 à 100 protéines par particule (Figure 64, a et b). Le greffage protéines/nanoparticules repose sur la chélation de Ni²⁺ par les protéines sur les nanoparticules. Cette interaction est labile, nous nous sommes donc assurés de la stabilité du couplage pour la durée de nos expériences. Pour cela le taux de greffage du complexe a été mesuré à différents temps. Nous avons rincé le couplage dans du tampon XB1, en présence de 2 mM de NiCl₂, nous l'avons reconcentré par centrifugation, et nous avons mesuré la quantité de protéines restant greffées aux nanoparticules avec un gel dénaturant. Après trois heures (une durée supérieure à la durée de nos expériences) plus de 80% des protéines étaient encore conjuguées aux particules (Figure 64, c).

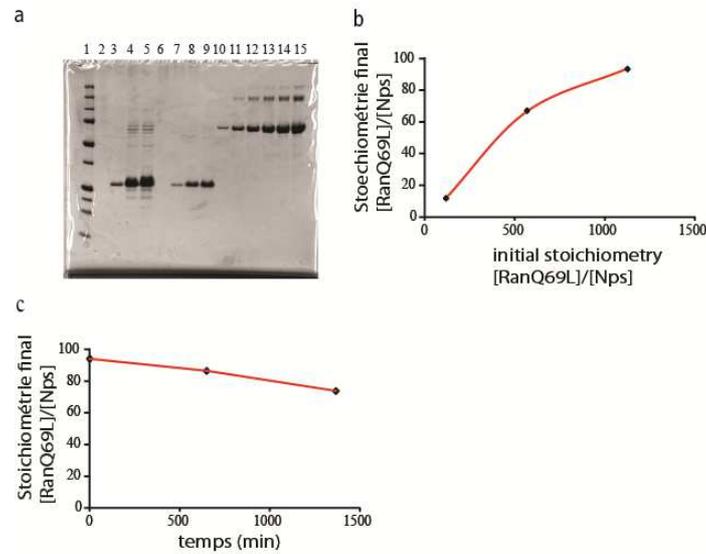


Figure 64 Caractérisation du complexe Ran-NP. (a,b) Détermination de la stœchiométrie de couplage par électrophorèse SDS-PAGE. (a) Electrophorèse sur gel de complexes Ran-NP de différentes stœchiométries. Puit 1: standard de poids moléculaire, puits 2 à 5: complexes non purifiés avec différents ratio RanQ69L/NP. ratios initiaux: puit 2 = 0; puit 3 = 130; puit 4 = 600; puit 5= 1300; puits 6 à 9 : complexes purifiés; puits 10 à 15 :gamme BSA : puit 10= 0,1 µg BSA; puit 11= 0,5 µg BSA; puit 12= 1 µg BSA; puit 13 = 1,5 µg BSA; puit 14 =2 µg BSA; puit 15 = 3 µg BSA. (b) ratio molaire final de RanQ69L/NP en fonction du ratio initial. (c) Détermination de la stabilité du complexe Ran-NP.

3.2.3. Fonctionnalité du couplage

Nous avons ensuite testé la fonctionnalité du complexe Ran-NP. Pour le complexe Ran-NP nous avons trouvé la même dépendance en concentration que pour le RanQ69L libre. Les asters ont été formés avec la même échelle de temps et avec une morphologie identique à ceux formés par du RanQ69L libre (Figure 65).

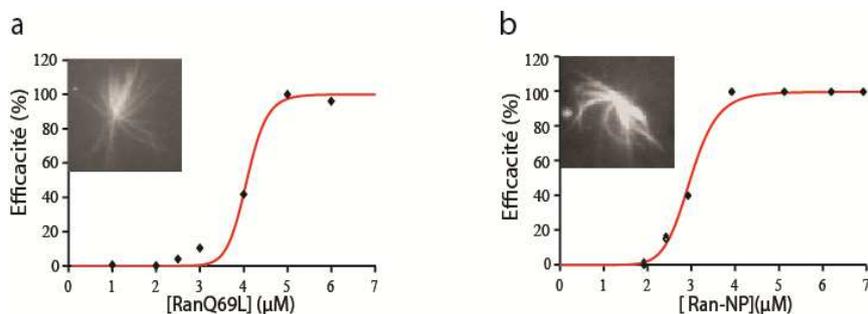


Figure 65 Caractérisation du complexe Ran-NP : seuil de nucléation. (a,b) Seuil de formation des asters pour du RanQ69L libre (a) ou conjugué à des nanoparticules (b). La densité d'aster a été déterminée par microscopie de fluorescence et normalisée à 100% pour la densité la plus élevée.

3.3. Génération d'un gradient de RanGTP dans un environnement confiné

3.3.1. Effet des nanoparticules en l'absence de champ magnétique : distribution homogène de RanGTP

Nous avons ensuite introduit le complexe Ran-NP à 6 μM dans un environnement confiné, des gouttes d'extrait cellulaire. En l'absence de champ magnétique la distribution des nanoparticules magnétiques, et donc la concentration de RanQ69L, est homogène. Dans ces conditions les pôles des asters sont statistiquement positionnés près du centre de la goutte (Figure 66).

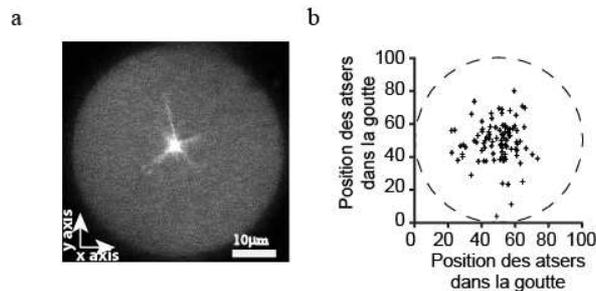


Figure 66 (a) Observation par microscopie de fluorescence d'un aster à l'intérieur d'une goutte. (b) En l'absence de champ magnétique la position du pôle des asters est proche du centre de la goutte ($n= 97$). Le diamètre des gouttes a été normalisé à 100.

3.3.2. Perturber la position des asters avec un gradient de RanGTP

Nous avons ensuite étudié l'effet d'un gradient de RanGTP sur l'auto-assemblage des asters en milieu confiné. Nous avons de nouveau encapsulé l'extrait cellulaire et Ran-NP dans des gouttes, puis nous avons introduit l'émulsion dans un capillaire positionné contre un aimant permanent pour former un gradient de nanoparticules magnétiques, donc un gradient de RanQ69L.

La concentration initiale de la protéine RanQ69L couplée aux nanoparticules est comprise entre 4 et 8 μM , c'est-à-dire au-dessus du seuil de nucléation. Sous l'action d'un champ magnétique nous avons asymétrisé les nanoparticules en quelques minutes (environ trois minutes, un temps plus court que la formation des asters qui prend une vingtaine de minutes). Nous avons ensuite observé la position du pôle des asters : au contraire du cas sans champ magnétique présenté plus haut, la position moyenne du pôle des asters est décalée dans la direction opposée au maximum du gradient, d'une distance équivalente à 8% du diamètre de la goutte (Figure 67, a, b, c). Pour vérifier que le gradient de nanoparticules n'entraînait pas de « gêne stérique » qui pourrait expliquer le décalage observé, nous avons réalisé la même expérience avec des nanoparticules couplées avec du PEG-PLL. Les microtubules ont été polymérisés avec RanQ69L libre à 6 μM . Nous n'avons pas observé de décalage significatif des asters (Figure 67, d).

Ces résultats montrent qu'une asymétrie dans la distribution de la protéine RanQ69L peut perturber la position spatiale des asters.

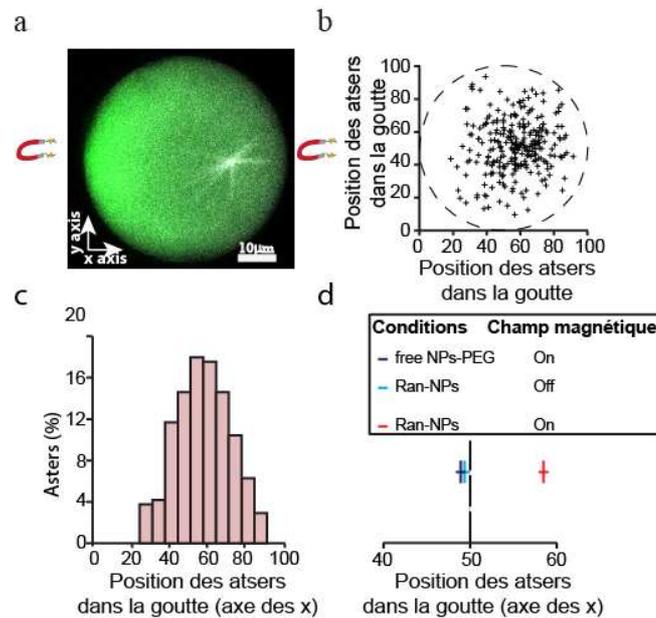


Figure 67 Un gradient de Ran-NP entraîne une asymétrie dans la position des asters. (a) Exemple d'un goutte d'extrait avec un gradient de nanoparticules fluorescentes (vert). (b) Sous l'action d'un champ magnétique, la position du pôle des asters est décalée par rapport au centre de la goutte d'extrait cellulaire. (c) Histogramme représentant la position du pôle des asters dans la direction du champ magnétique. (d) Position moyenne du pôle des asters dans la direction du champ magnétique pour trois conditions : nanoparticules magnétiques recouvertes de PEGs et RanQ69L libre (noir, n=100), Ran-NPs sans champ magnétique (bleu, n=100), Ran-NPs sous l'action d'un champ magnétique (rouge, n=240).

Nous avons observé une variabilité dans la pente des gradients de nanoparticules que nous avons obtenus avec notre montage expérimental, sûrement due à la variabilité de la distance goutte/aimant (de 50 à 500 μm). Nous avons séparé nos gradients en trois catégories, des plus faibles au plus élevés, correspondant à une augmentation moyenne de la concentration de RanQ69L au maximum du gradient d'un facteur 1.2, 1.6 et 1.9 respectivement (Figure 68).

Gradient de protéines de signalisation

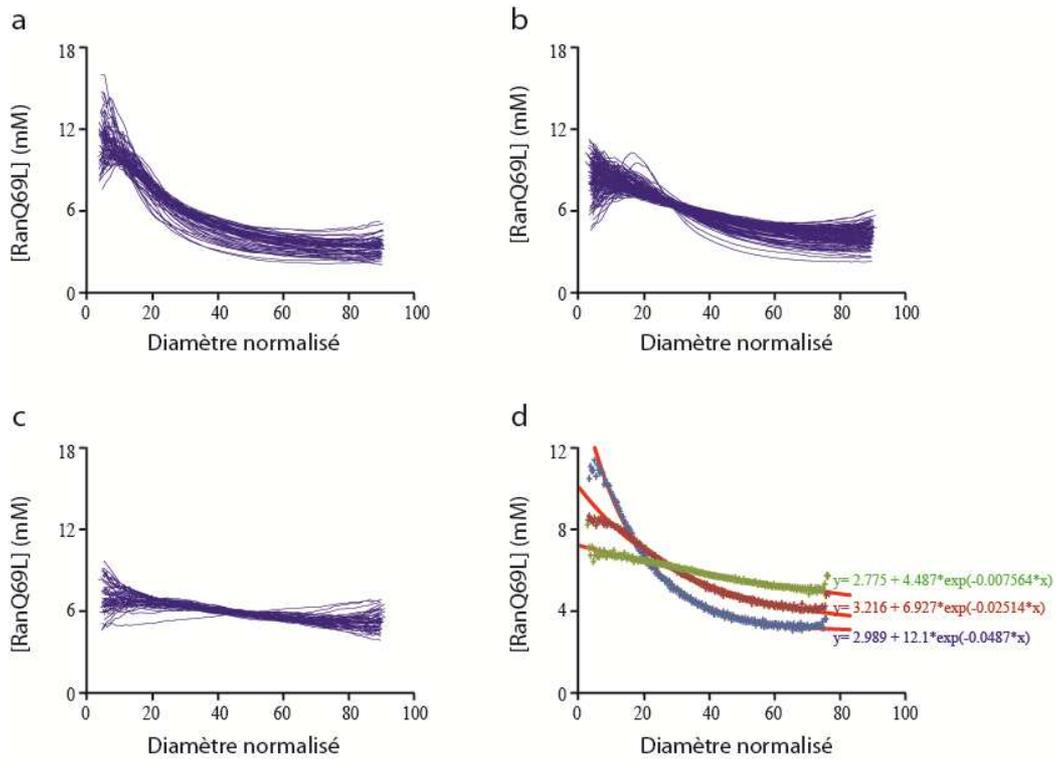


Figure 68 Classification des gradients. (a,b,c) Gradient de concentration de RanGTP pour des gradients forts (a), moyens (b) et faibles (c). (d) Moyenne des profils de concentration pour chaque catégorie.

Plus l'asymétrie est importante, plus l'aster est éloigné du maximum du gradient de Ran-NP. Nous avons observé un décalage respectif de 11 %, 6 % et 3 % pour gradients forts, moyens et faibles (Figure 69). Ces résultats mettent en lumière une relation directe entre l'augmentation locale de la concentration de RanQ69L au maximum du gradient et la position de l'aster dans la goutte.

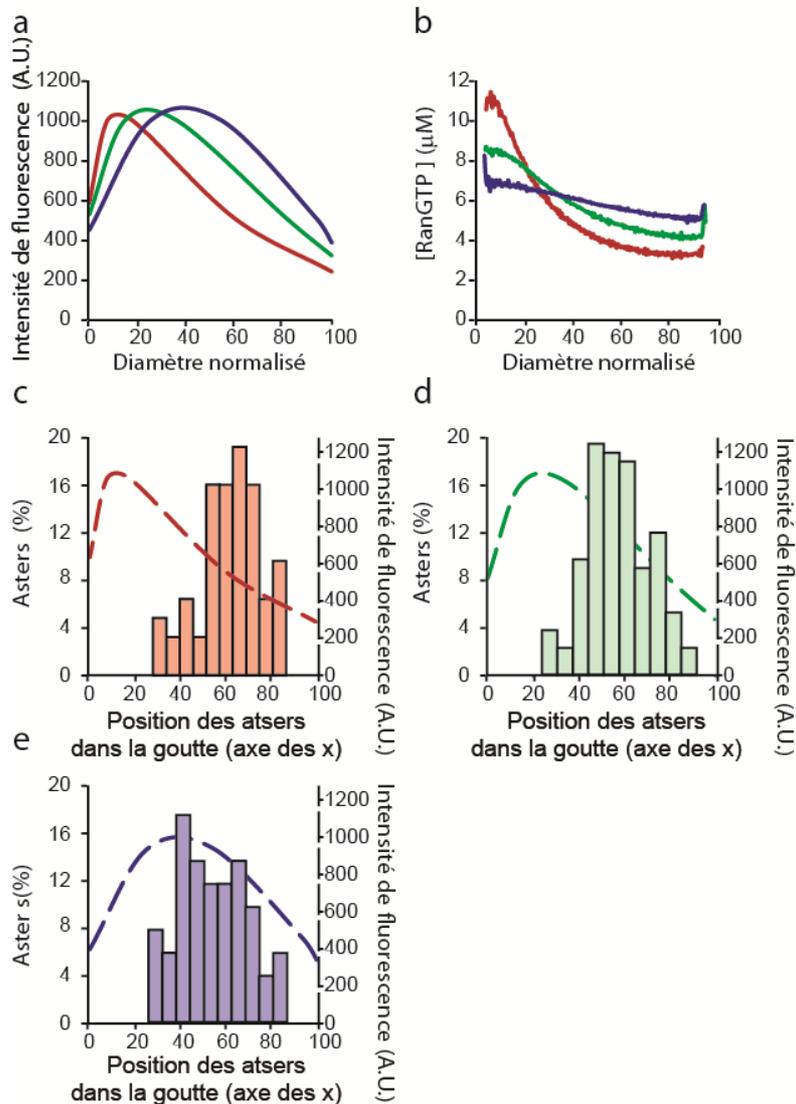


Figure 69 Le gradient de RanQ69L influence la position des asters. (a) Moyenne des profils de fluorescence pour chaque catégorie. (Rouge, n=78; Vert, n=120; Bleu n=42). (b) Moyenne des profils de concentration pour chaque catégories correspondant à une augmentation maximale de concentration de 1,9 (rouge), 1,6 (vert), et 1,2 (bleu). (c,d,e) Histogramme de la position du pôle des asters dans la direction du champ magnétique pour chaque catégorie de gradient.

Un gradient spatial de RanGTP conduit donc à briser la symétrie positionnelle d'un aster en géométrie confinée.

4. Discussion

Comment une asymétrie spatiale de biomolécules peut-elle générer un décalage dans la position du pôle des asters en géométrie confinée ?

Nous allons dans un premier temps présenter quelques éléments et mécanisme susceptibles d'intervenir dans notre système, puis nous discuterons de modèles possibles expliquant nos observations.

4.1. Éléments en présence

4.1.1. Microtubules

Les microtubules sont des polymères rigides, avec un module de courbure élastique de $B = 25 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^2$ mesuré *in vitro*⁷. Leur flambage peut être décrit par une instabilité d'Euler, ainsi un microtubule de $L = 10 \mu\text{m}$ a une force critique de flambage : $F_f = \pi^2 \frac{B}{L^2} = 2,5 \text{ pN}$.

4.1.2. Gouttes d'extrait cellulaire

Les gouttes que nous générons ont une tension de surface $\gamma = 7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ¹⁴⁴. Pour déformer l'interface extrait-goutte, un microtubule en croissance devra générer des forces de polymérisation supérieures à la force capillaire $F_c = 2\pi r \gamma \cos\alpha$, avec r le rayon de la fibre ($\sim 30 \text{ nm}$) et α l'angle de contact entre le microtubule et la goutte¹⁴⁴. F_c est de l'ordre du nN et on peut donc considérer que les gouttes sont rigides et indéformables face aux forces produites par la polymérisation des microtubules ($\sim \text{pN}$)¹¹.

4.1.3. Gradient de RanGTP

Le gradient de RanGTP est impliqué dans l'assemblage du fuseau mitotique à travers différentes protéines, dont TPX2 qui contrôle la nucléation des microtubules et CDK11 qui stabilise les extrémités « + » des microtubules⁶²(Figure 70).

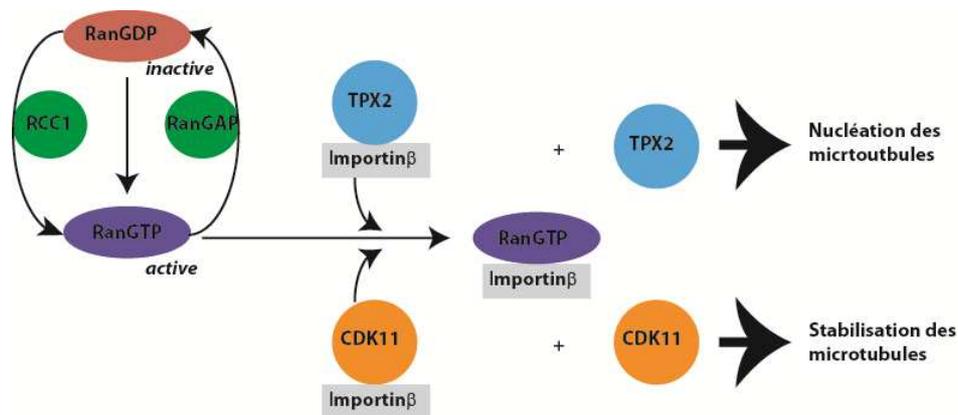


Figure 70 Voie de signalisation de Ran. Ran est activé sous forme GTP par RCC1 et désactivé par RanGAP. Sous forme GTP Ran peut se lier à l'importin β et libérer TPX2, qui nucléé les microtubules et CDK11 qui les stabilise.

RanGTP se lie à l'importin β qui libère des protéines contenant un signal NLS (Nuclear Localization Signal), parmi lesquelles se trouvent TPX2 et CDK11. Un gradient de RanGTP crée donc un gradient de TPX2 et CDK11^{63, 133} (Figure 71).

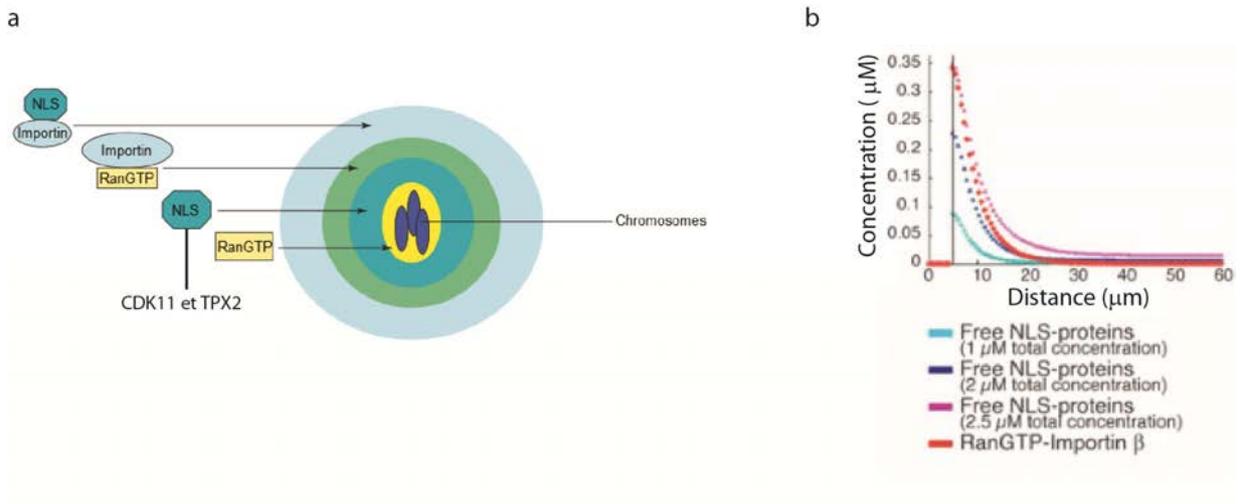


Figure 71 Prédiction théorique sur les gradients de NLS (TPX2 et CDK11). a, un gradient de RanGTP de courte portée a été observé autour des chromosomes. Un gradient à plus longue portée de RanGTP-importine β a également été observé. Des gradients de NLS (TPX2 et CDK11) ont été prédits théoriquement. Tiré de [133]. b, Calcul théorique de gradients de NLS engendrés par le gradient de RanGTP. Tiré de [63].

Contrairement au gradient de RanGTP, les gradients de TPX2 et CDK11 n'ont pas été observés directement, mais ils ont été étudiés théoriquement.

4.1.3.1. Effet d'un gradient de TPX2 (gradient de nucléation) sur les asters

À l'aide des nanoparticules magnétiques, nous avons généré un gradient de RanGTP, qui s'étend sur 20 à 30 % du diamètre de la goutte en moyenne. Ce gradient de RanGTP crée un gradient nucléation, *via* TPX2. Une hypothèse serait donc que la probabilité de nucléation des asters soit corrélée au gradient de TPX2 (Figure 72). Avec une nucléation localisée nous devrions observer les pôles des asters au voisinage du gradient de RanGTP, ce qui n'est pas le cas.

Gradient de protéines de signalisation

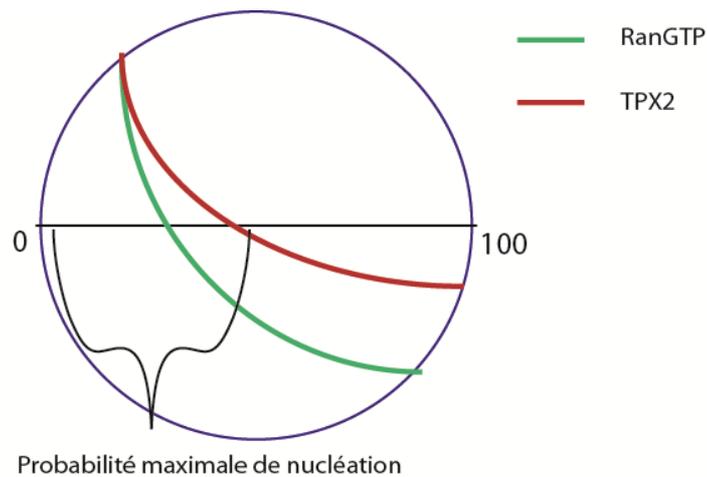


Figure 72 Schéma du gradient de TPX2 créé par le gradient de RanGTP en géométrie confinée.

Sur la figure 73 nous avons représenté l'évolution de la position d'un aster dans une goutte en fonction du temps. Dix minutes après le début de l'expérience, l'aster est du côté du gradient de RanGTP, proche du bord de la goutte, ce qui est cohérent avec une nucléation au voisinage du maximum de concentration de TPX2 libre. Le pôle de l'aster va se décaler pour atteindre la deuxième moitié de la goutte.

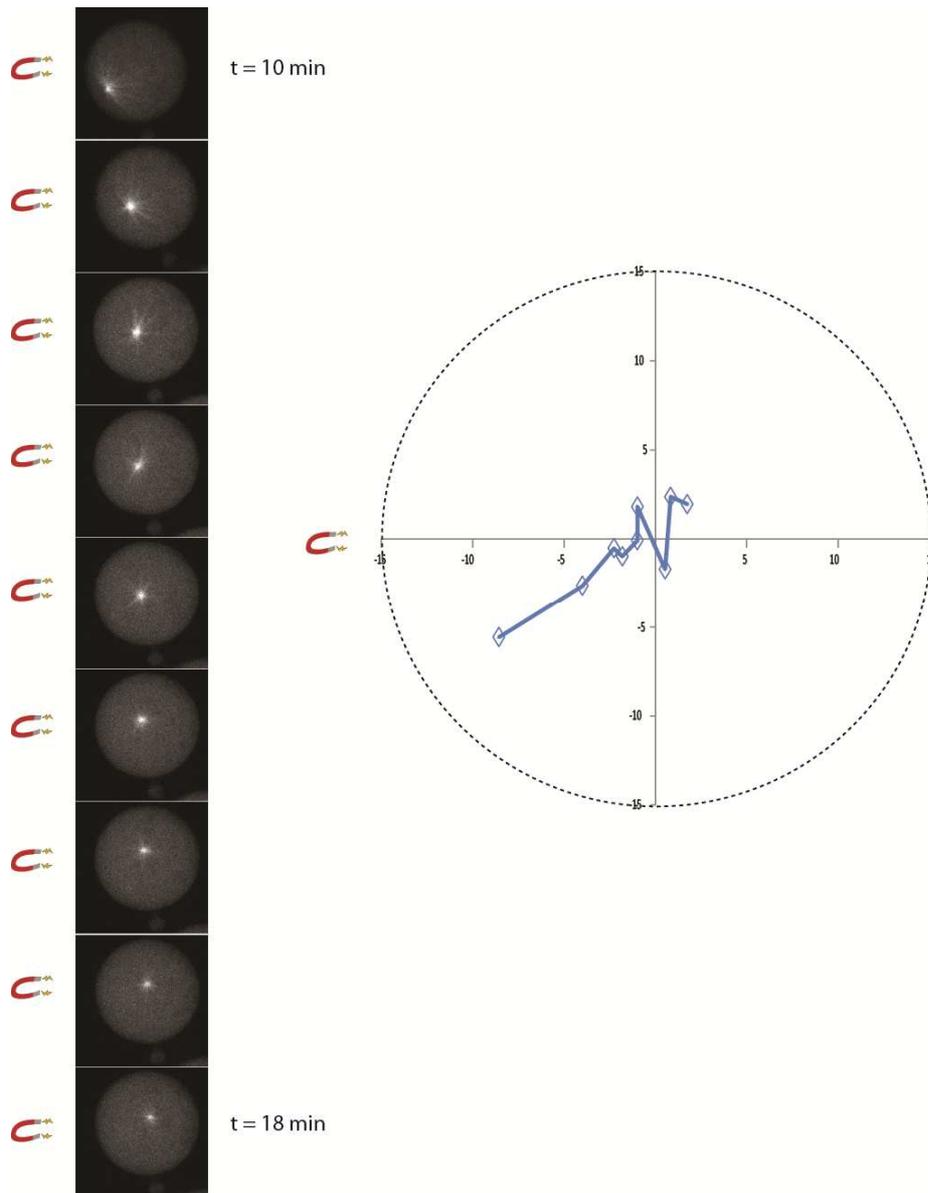


Figure 73 Évolution de la position d'un aster dans une goutte en fonction du temps.

4.1.3.2. Effet d'un gradient de CDK11 (gradient de stabilisation) sur les asters

Pour étudier la stabilisation des microtubules induite par RanGTP Athale et *al.* ont utilisé une bille recouverte de chromatine¹⁴⁵. Sur la chromatine se trouve le facteur d'échange RCC1 qui phosphoryle RanGDP en RanGTP. Un gradient de RanGTP-importine β et donc un gradient de CDK11 sont créés via un phénomène de réaction-diffusion. Les asters ont été nucléés par des centrosomes, les auteurs ont donc étudié ici la stabilisation des microtubules induite par RanGTP. Ils ont observé que les asters suffisamment proches de la bille de chromatine (mais sans contact avec elle) deviennent asymétriques (avec des microtubules plus longs du côté de la bille de

chromatine). Ils en ont déduit que RanGTP induisait un gradient de stabilisation de l'extrémité « + » microtubules qu'ils ont attribué à CDK11 (Figure 74).

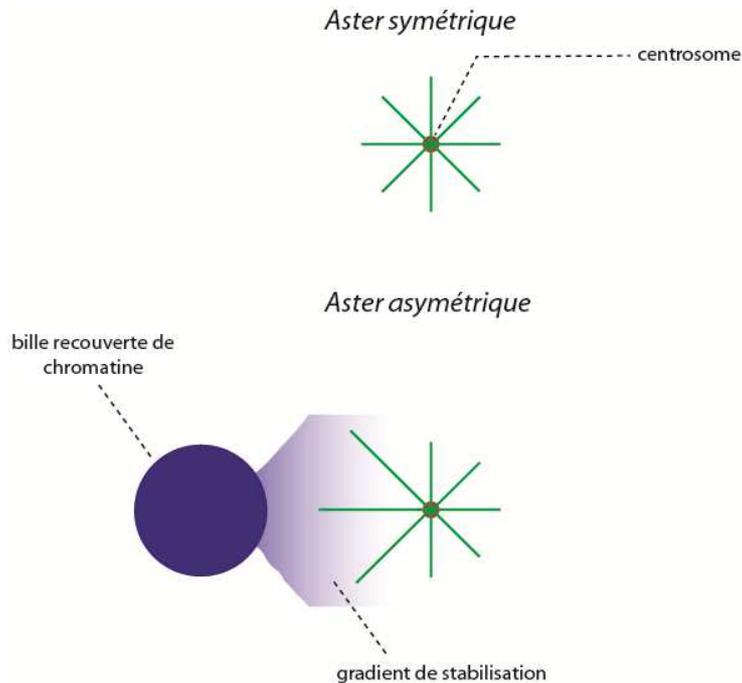


Figure 74 Un aster polymérisé par un centrosome en l'absence de chromatine est symétrique. En présence de chromatine, un gradient de stabilisation rend l'aster asymétrique, avec des microtubules plus longs dans la direction du gradient.

Le gradient de RanGTP créé avec nos nanoparticules fonctionnalisées pourrait donc engendrer un gradient de stabilisation des microtubules et rendre les asters asymétriques, bien que les conditions de notre étude soient différentes (asters non fixés dans l'espace, en géométrie confinée, polymérisé sans centrosome).

4.1.4. Moteurs moléculaires : dynéines

Les dynéines permettent l'auto-organisation des microtubules en asters (Voir Figure 62, chapitre 2). Elles peuvent aussi jouer un rôle dans le positionnement du fuseau. Dans certains organismes, comme l'embryon de *C. elegans*, la dynéine corticale applique des forces de traction sur les microtubules astraux, qui permettent de positionner le fuseau. Dans les cellules plus larges, comme les œufs de Xénope, où les asters n'atteignent pas nécessairement le cortex cellulaire, il a été montré que la dynéine cytoplasmique accrochée sur les organelles cytoplasmiques pouvaient exercer des forces de traction qui permettent de positionner des asters et des fuseaux de microtubules²⁹ (voir Chap.1).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer nos résultats, qui s'appuient sur les différents éléments que nous venons de présenter.

4.2. Mécanisme 1 : délocalisation des asters induite par des forces de polymérisation

La polymérisation des microtubules quand elle est localisée près d'une membrane rigide, peut générer une force suffisante pour déplacer les fibres^{12, 146} (voir Chap.1).

Appliquée à notre système, cette observation suggère que les microtubules en contact avec la paroi de la goutte et stabilisés par le gradient vont exercer des forces de polymérisation conduisant au décalage du pôle de l'aster (Figure 75).

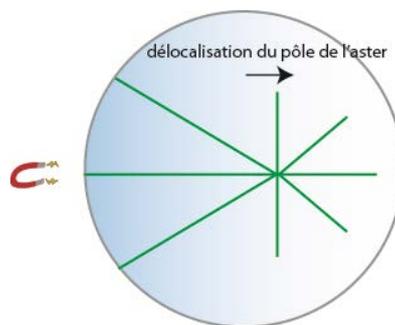


Figure 75 Aster se déplaçant grâce à la polymérisation des microtubules contre la surface dans une goutte.

Nous avons cherché à expliquer le décalage observé dans la position du pôle des asters avec des arguments géométriques, en considérant la goutte et l'aster comme des objets rigides qui s'excluent.

Prenons un aster symétrique confiné dans une goutte de diamètre plus important que la longueur de l'aster (Figure 76).

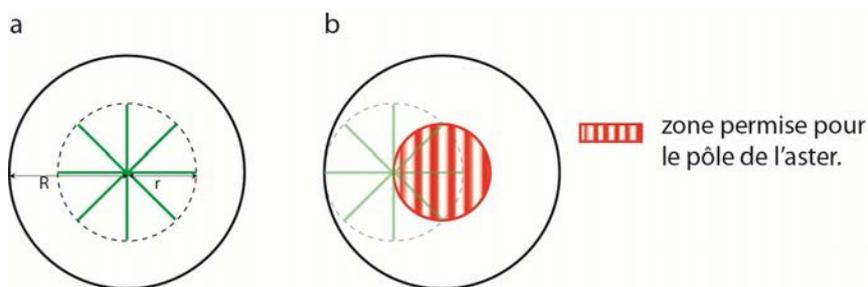


Figure 76 Aster symétrique dans une goutte. a, L'aster peut être représentée par un cercle de même diamètre. b, La rigidité de l'aster définit une zone d'exclusion pour le pôle de l'aster.

L'aster est symétrique, il peut donc être représenté par un cercle de centre P, le pôle de l'aster et de rayon r . La goutte a un rayon R .

Comme nous l'avons vu précédemment, la goutte peut être considérée comme rigide pour l'aster. Nous pouvons donc définir une zone d'exclusion pour le pôle des asters, déterminée par la

longueur des microtubules. La zone permise pour le pôle de l'aster est un cercle au centre de la goutte, de rayon $a=R-r$ (Figure 77).

Si on prend un grand nombre d'aster réparti aléatoirement dans cette configuration, la position moyenne du pôle des asters sera au centre de gravité de la zone permise, c'est-à-dire au centre de la goutte.

Le gradient de RanGTP pourrait générer des asters asymétriques, avec des microtubules plus longs du côté du gradient.

Considérons donc maintenant un aster asymétrique.

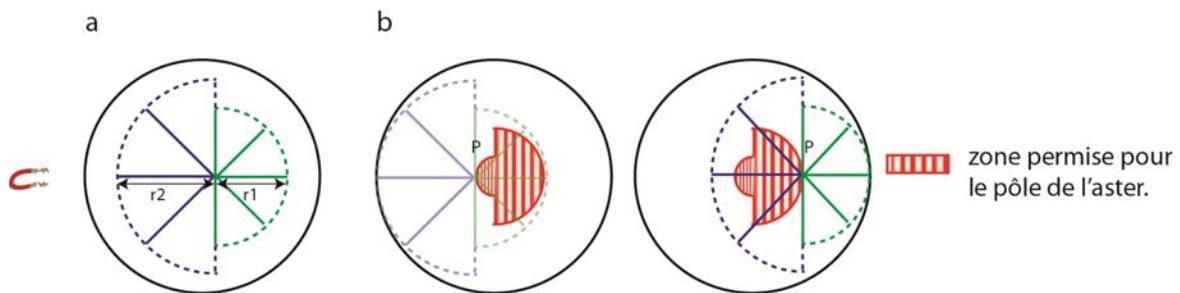


Figure 77 Aster asymétrique dans une goutte. a, L'aster peut être représentée par deux demi-cercles. b, La rigidité de l'aster définit une zone d'exclusion pour le pôle de l'aster, qui dépend de la longueur des microtubules de chaque côté de la goutte.

Le pôle de l'aster se trouve maintenant dans deux demi-cercles de rayon $r1$ et $r2$. La zone permise pour le pôle de l'aster est donc formé par deux demi-cercles. Un demi-cercle de rayon $a1=R-r2$ du côté de l'aimant, et un autre plus grand de rayon $a2 =R-r1$ de l'autre côté (Figure 71).

Si on prend un grand nombre d'asters, la position moyenne des pôles de ces asters sera au centre de gravité G de la zone permise (Figure 78).

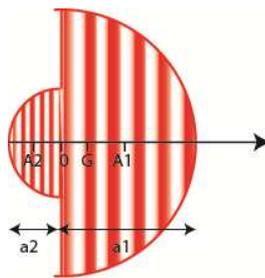


Figure 78 Zone permise pour le pôle de l'aster dans le cas asymétrique

Soit $A2$ le centre de gravité du petit cercle, $A1$ celui du grand cercle et G celui de l'ensemble (Figure 78).

$$OA2 = \frac{4.a2}{3\pi} \text{ et } OA1 = \frac{4.a1}{3\pi} \text{ (théorème de Gulvin)}$$

$S1.GA1 + S2GA2 = 0$, avec $S1$ et $S2$ la surface de chaque demi-cercle.

$$\text{Soit } GA1 = \frac{S2}{S1+S2} . A1A2 \text{ (relation de Challes)}$$

$$\text{C'est-à-dire, } GA1 = \frac{a2^2}{a1^2+a2^2} \cdot A1A2 = \frac{a2^2}{a1^2+a2^2} \left(\frac{4}{3\pi} a1 + \frac{4}{3\pi} a2 \right)$$

Nous avons mesuré un diamètre moyen de 15 μm pour nos asters en volume, donc $r1 = 7,5 \mu\text{m}$. Considérons une goutte de 60 μm de diamètre, la valeur du décalage du pôle par rapport au centre de la goutte est représentée figure 79, en fonction du degré d'asymétrie de l'aster.

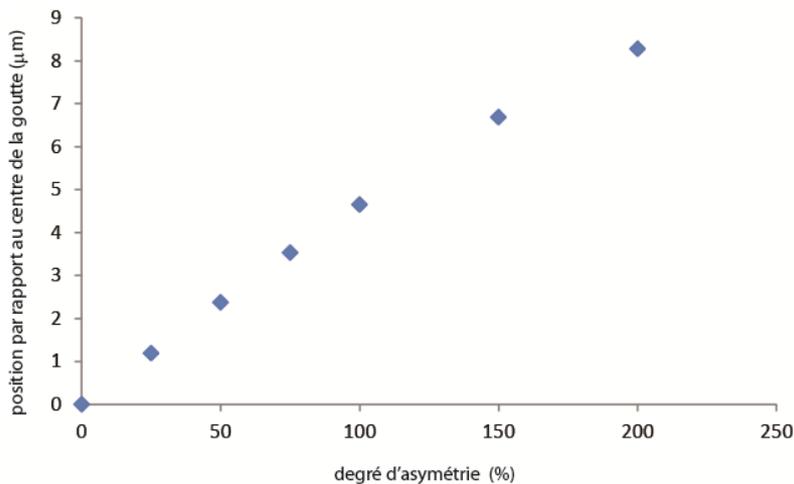


Figure 79 Position du pôle de l'aster en fonction du degré d'asymétrie.

Par exemple pour une asymétrie de 50 %, c'est-à-dire un rayon $r2 = 1,5 \cdot r1 = 11,25 \mu\text{m}$, le décalage serait de 2,3 μm . On a donc un décalage d'environ 4 % du diamètre de la goutte, inférieur au décalage observé dans nos expériences. Dans nos expériences nous avons essentiellement observé le pôle des asters, en effet, au sein des gouttes les microtubules sont difficilement visibles par microscopie à épifluorescence, nous n'avons donc pas d'informations sur le degré d'asymétrie des asters.

Nous n'avons pas pris en compte dans nos explications le fait que l'aster se trouve dans un environnement tridimensionnel et peut sédimenter, ce qui accroît les possibilités de contact avec le bord de la goutte. Par ailleurs, les asters pourraient également exercer des forces de poussée sur les nombreuses organelles présentes dans les extraits cellulaires.

4.3. Hypothèse 2 : forces de traction due aux moteurs moléculaires

4.3.1. Dépendance entre la force de traction et la longueur des microtubules

Des dynéines cytoplasmiques accrochées sur des organelles peuvent appliquer des forces de traction sur les microtubules³⁰.

La force totale exercée par les dynéines sur les microtubules est reliée à la longueur de ceux-ci¹⁴⁷. En effet cette force dépend du nombre de dynéines accrochées sur les microtubules, et ce nombre est proportionnel à la longueur des fibres. Dans notre système, si le gradient de RanGTP induit

une asymétrie dans la longueur des microtubules, ils seront plus longs du côté du gradient de RanGTP (Figure 80).

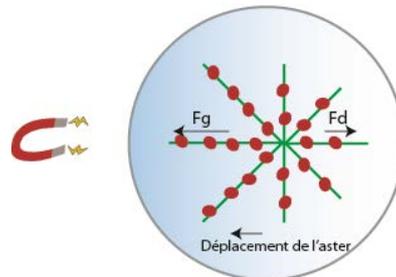


Figure 80 Effet de l'asymétrie des asters sur les forces de traction. Les microtubules sont plus longs près du maximum du gradient de RanGTP, et ont une plus grande probabilité d'interagir avec les dynéines. Il en résulte une force plus importante et un déplacement de l'aster vers le gradient.

Les dynéines seront donc plus nombreuses sur les microtubules et la force de traction plus importante du côté du gradient. A l'inverse, nous observons une délocalisation des asters à l'opposé du gradient, ce mécanisme ne peut donc pas expliquer nos observations.

4.3.2. Distribution des dynéines dans la goutte

Une condition permettant une délocalisation des asters par les dynéines serait que celles-ci soient plus nombreuses ou plus actives du côté du gradient de RanGTP (Figure 81).

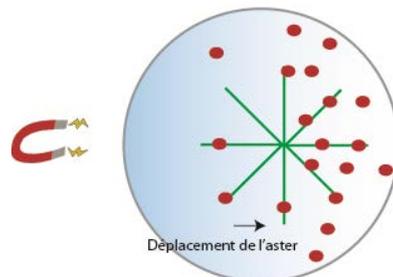


Figure 81 Effet d'une distribution asymétrique des dynéines sur les forces de traction. Les dynéines sont plus nombreuses à l'opposé du gradient de RanGTP. Il en résulte une force plus importante et un déplacement de l'aster à l'opposé du gradient.

Pour que cette hypothèse soit réalisable, un mécanisme serait que RanGTP puisse réguler la dynéine ou une protéine impliquée dans son fonctionnement. Une étude récente effectuée sur des cellules humaines a montré que le gradient de RanGTP avait un effet sur la distribution spatiale des dynéines corticales, avec un mécanisme impliquant la liaison de la dynéine avec la membrane plasmique (*via* les protéines NuMa et LGN). Les dynéines sont alors délocalisées vis-à-vis du gradient de RanGTP^{148, 149}.

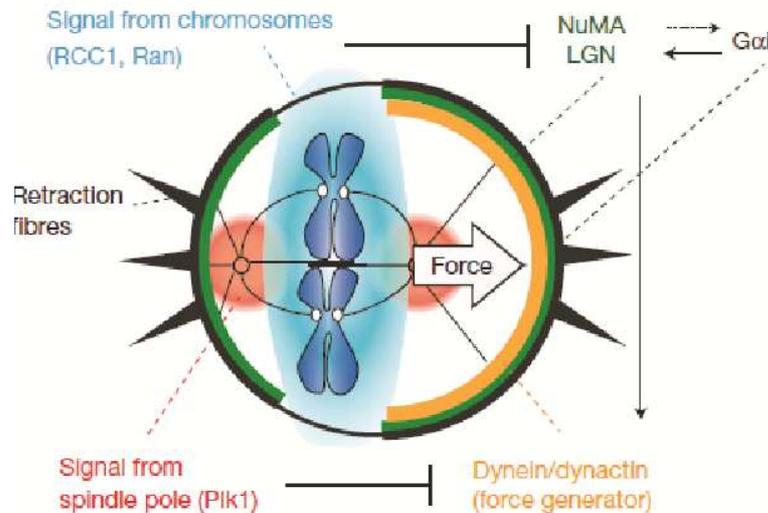


Figure 82 Mécanisme de positionnement du fuseau mitotique. Le gradient de RanGTP influence la liaison de NuMa-LGN avec le cortex, ce qui délocalise les dynéines et change le rapport de forces. Tiré de [149]

Un mécanisme similaire, impliquant la dynéine, NuMa et LGN, tous présents dans nos extraits de Xénope, pourrait expliquer nos résultats : une délocalisation des dynéines permettrait d'appliquer des forces plus importantes à l'opposé du gradient conduisant à un décalage des asters allant dans le sens de nos observations.

4.4. Conclusion

Ces différents modèles méritent de plus amples investigations pour confirmer ou infirmer nos hypothèses. Nous pourrions par exemple agir sur l'action (en ajoutant des inhibiteurs de dynéines) ou la localisation des dynéines.

Une autre perspective intéressante serait également d'examiner la robustesse de la position des asters vis-à-vis d'une perturbation spatiotemporelle. Nous pourrions par exemple tirer parti des propriétés de réversibilité du gradient de nanoparticules magnétiques pour étudier la position de l'aster dans un environnement biochimique fluctuant.

Nos résultats démontrent qu'il est possible d'utiliser des nanoparticules magnétiques pour générer un gradient de protéines de signalisation. Nous avons montré qu'un gradient de RanGTP rétroagissait sur la position d'asters de microtubules dans un extrait cellulaire de Xénope confiné. Ces résultats montrent comment des informations positionnelles du cytosquelette peuvent être codées dans la distribution spatiotemporelle d'une protéine de signalisation.

Chapitre 4 Localisation d'endosomes magnétiques

1. Introduction	88
2. Endocytose spécifique de l'Epidermal Growth Factor couplé aux nanoparticules magnétiques.	90
2.1. Internalisation et activation de l'EGFR	90
2.2. Internalisation de nanoparticules couplées à l'EGF	91
2.3. Dégradation de l'EGFR	92
3. Manipulation magnétique intracellulaire	94
3.1. Internalisation et mouvement des nanoparticules sans champ magnétique	94
3.2. Application d'un gradient de champ en utilisant une pointe magnétique.....	96
3.2.1. Simulation du gradient de champ magnétique	96
3.2.2. Caractérisation expérimentale de la pointe	98
3.3. Application aux transports magnétiques d'endosomes	100
3.3.1. Etudes de trajectoires d'endosomes magnétiques.....	100
3.3.2. Influence du réseau d'actine sur le transport magnétique des endosomes.....	106
3.3.3. Influence des microtubules sur le transport magnétique des endosomes.....	108
4. Discussion et perspectives	110
4.1. Discussion sur la méthode de la pointe	110
4.1.1. Irrégularité des trajectoires	110
4.1.2. Effet de la perturbation du cytosquelette	110
4.2. Conclusion sur la technique de la pointe magnétique	112
4.3. Perspectives	112

1. Introduction

Les récepteurs de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) sont une famille de récepteurs à tyrosine kinase (qui est activée en se liant à un groupe phosphate de l'ATP) dont la signalisation régule la motilité, la prolifération ou encore la différenciation d'un grand nombre de types cellulaires¹⁵⁰. Un mauvais fonctionnement (surexpression, défaillance dans l'internalisation, hétérodimérisation, ...) de l'EGFR est associé à l'apparition d'un grand nombre de cancers.

Les liens de la signalisation de l'EGFR avec le développement des cancers en font une cible prioritaire pour des applications thérapeutiques^{150, 151}. L'EGF couplé à des nanoparticules magnétiques a, par exemple, été utilisé pour cibler des cellules cancéreuses et faire de l'hyperthermie ciblée¹⁵². En effet, dans beaucoup de cellules cancéreuses le récepteur EGFR est surexprimé.

Dans ce chapitre nous avons étudié l'EGF comme système modèle pour contrôler magnétiquement la signalisation d'endosomes. L'EGF active la signalisation des récepteurs EGFR et les dimérise, ce qui conduit à leur internalisation. Les récepteurs et leurs ligands sont internalisés dans des vésicules qui vont fusionner avec les endosomes. Ils sont ensuite dégradés dans les lysosomes^{150, 153} (Figure 83). La signalisation de l'EGFR commence dès l'activation à la membrane plasmique et se poursuit jusqu'à la dégradation^{150, 154}. Suivre l'évolution de la localisation de l'EGFR dans les cellules est donc important pour étudier sa signalisation.

Localisation d'endosomes magnétiques

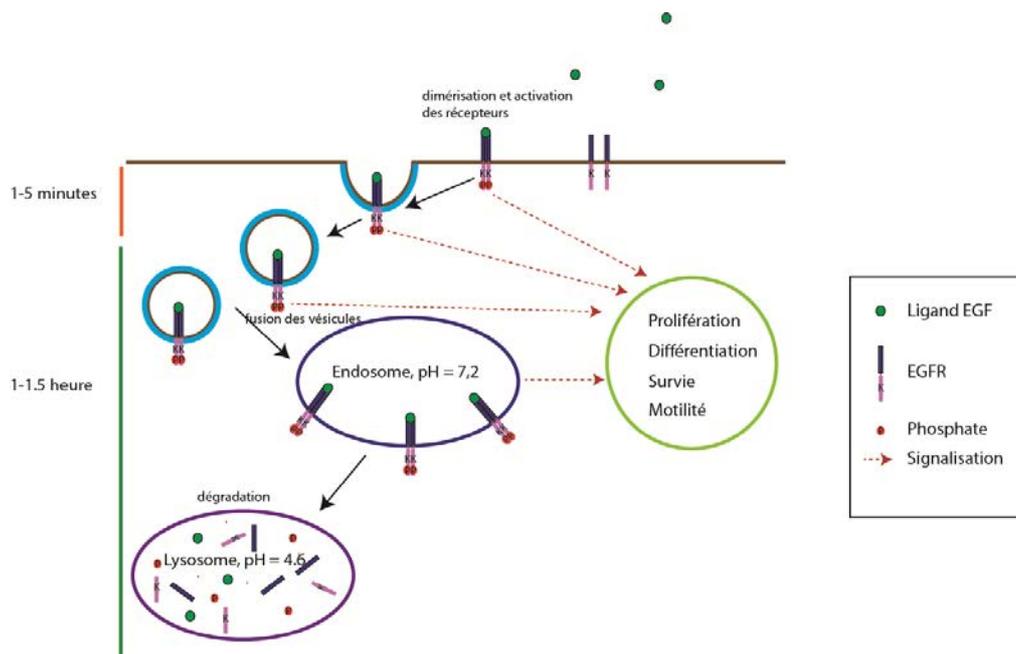


Figure 83 Internalisation de l'EGF et de l'EGFR. L'EGF se lie aux récepteurs et induit leur dimérisation et leur activation. Les récepteurs EGFR sont ensuite internalisés, toujours liés aux ligands EGF, dans des vésicules. Les vésicules fusionnent avec les endosomes puis la dégradation intervient dans les lysosomes. La signalisation de l'EGFR commence dès l'activation à la membrane et se poursuit jusqu'aux lysosomes.

Dans ce chapitre nous avons couplé le ligand EGF à des nanoparticules magnétiques, dans le but de contrôler magnétiquement la localisation des endosomes de signalisation. Nous avons voulu tester la causalité entre la position d'un endosome et la durée de sa signalisation (voir Chapitre 1) (Figure 84). Pour cela nous avons internalisé dans des cellules HeLa des nanoparticules couplées à l'EGF et nous avons dans un premier temps vérifié que le récepteur EGFR activé était présent à la surface des endosomes magnétiques. Nous avons ensuite cherché à mettre au point un dispositif expérimental permettant de contrôler la localisation de la signalisation de l'EGFR. Nous présentons ici les résultats préliminaires sur ce sujet.

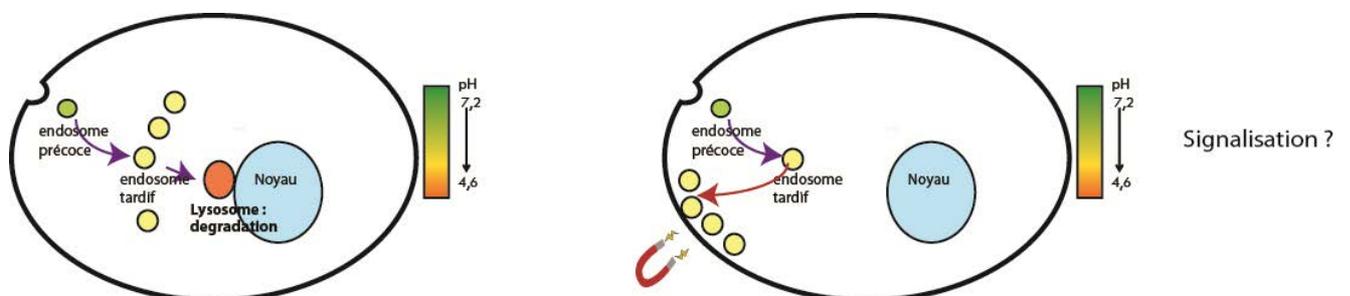


Figure 84 Principe général. Contrôle magnétique de la localisation d'endosomes.

2. Endocytose spécifique de l'Epidermal Growth Factor couplé aux nanoparticules magnétiques

Nous avons étudié l'internalisation de l'EGF couplé à des nanoparticules magnétiques et l'activation des récepteurs EGFR résultante.

2.1. Internalisation et activation de l'EGFR par l'EGF

Dans un premier temps nous avons étudié l'internalisation de l'EGFR en présence d'EGF libre (non couplé aux nanoparticules). Pour observer l'internalisation de l'EGFR, nous avons utilisé une technique d'immunofluorescence : un anticorps primaire reconnaît l'EGFR, puis un second anticorps fluorescent reconnaît l'anticorps primaire (noté EGFR 488 dans les figures, voir Méthodes). Nous avons observé le signal de l'EGFR dans les cellules dans trois conditions : sans EGF, avec une incubation de l'EGF à 4° C pendant une heure vingt minutes, et enfin, avec une incubation de l'EGF pendant une heure à 4° C, puis vingt minutes à 37 °C. L'incubation à 4 °C permet de lier les ligands aux récepteurs en surface, tout en bloquant l'endocytose.

Sans EGF et avec une incubation de l'EGF uniquement à 4 °C on observe un signal similaire, fait de points fluorescents, qui sont caractéristiques des récepteurs en surface des cellules (Figure 85, a et b).

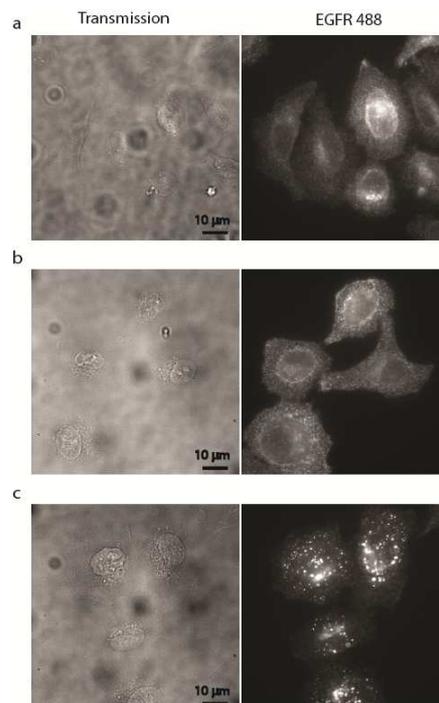


Figure 85 Internalisation de l'EGF et observation des récepteurs EGFR par immunofluorescence. a, Sans EGF. b, Cellules incubées avec de l'EGF, à 4 °C. c, Cellules incubées avec de l'EGF, à 4 °C puis à 37 °C.

A 37 °C, en revanche, l'internalisation a lieu, et après 20 minutes on observe des points fluorescents bien définis, caractéristiques de celle-ci¹⁵⁵ (Figure 85, c).

2.2. Internalisation de nanoparticules couplées à l'EGF

Nous avons ensuite couplé l'EGF à des nanoparticules magnétiques Ademtech de 120 nm en utilisant le même protocole que pour la protéine RanQ69L (voir chapitres 2 et 3). Pour vérifier la spécificité de l'internalisation nous avons utilisé plusieurs stratégies. Dans un premier temps, nous avons greffé de l'EGF fluorescent sur les nanoparticules magnétiques. Nous avons ensuite incubé le complexe nanoparticules-EGF fluorescent (NP-EGF568) avec les cellules pour vérifier l'endocytose du ligand EGF fluorescent et du récepteur EGFR. Nous avons observé une colocalisation du signal de l'EGF avec celui des récepteurs EGFR, indiquant que l'EGF est bien endocyté (Figure 86, a). Nous avons ensuite vérifié si les nanoparticules magnétiques étaient également endocytées. Pour cela nous avons utilisé des nanoparticules fluorescentes sur lesquelles nous avons greffé l'EGF. Nous avons observé une colocalisation du signal des nanoparticules magnétiques avec celui des récepteurs EGFR. Les nanoparticules magnétiques sont donc internalisées dans les endosomes avec l'EGF couplé et l'EGFR (Figure 86, b).

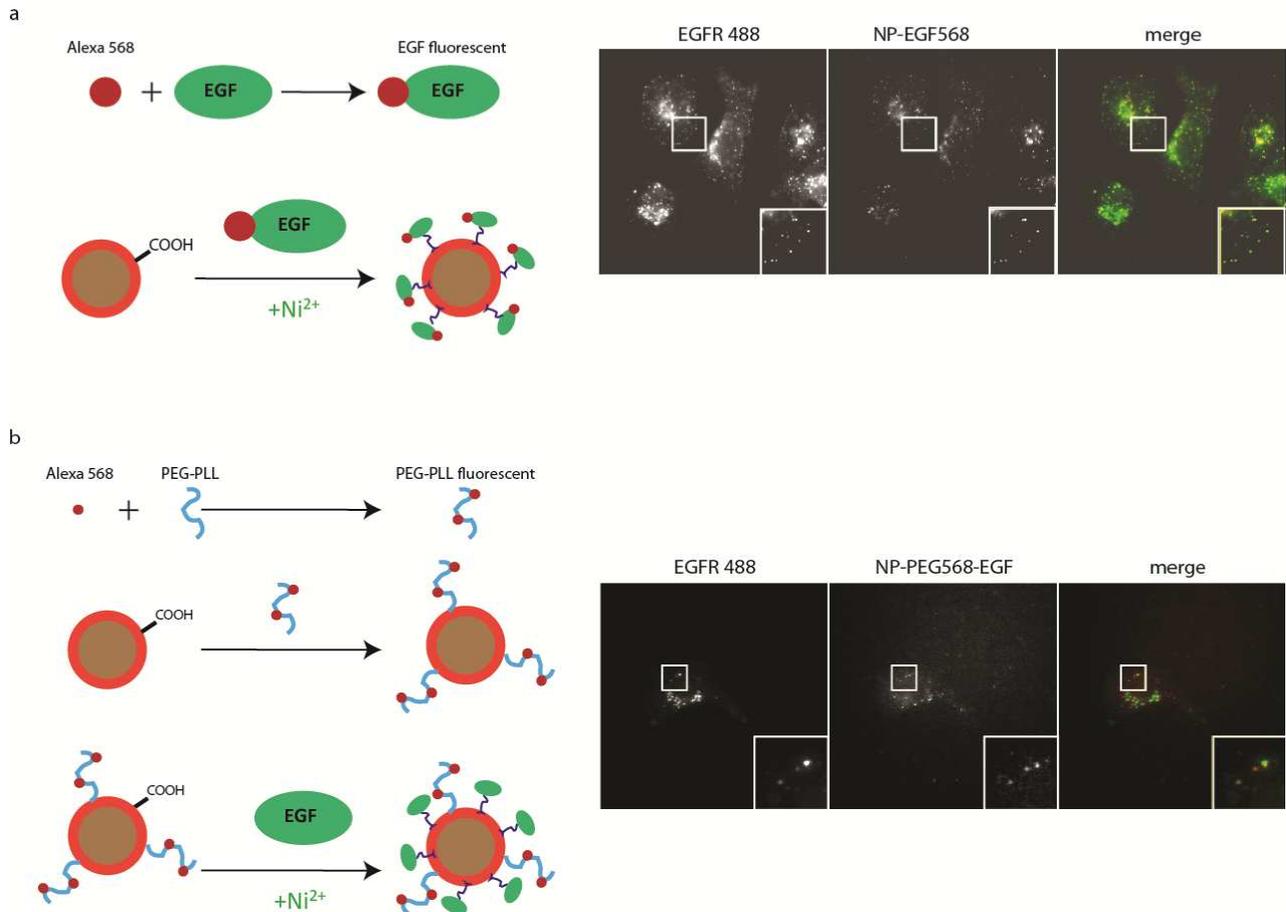


Figure 86 Contrôle de l'internalisation spécifique de l'EGF et de l'EGFR. a, EGF fluorescent couplé aux nanoparticules. Gauche : stratégie de couplage. L'EGF est tout d'abord couplé avec l'Alexa568, puis couplé aux nanoparticules. Droite : colocalisation des récepteurs EGFR 488 avec les NP-EGF-Alexa 568. b, Contrôle de l'internalisation de l'EGF couplé aux nanoparticules fluorescentes. Gauche : stratégie de couplage, les nanoparticules sont tout d'abord couplées à du PEG-Alexa568, puis à de l'EGF. Droite : colocalisation des récepteurs EGFR 488 avec les NP-PEG-Alexa568-EGF.

2.3. Dégradation de l'EGFR induite par l'internalisation des NP-EGF568

En accord avec la littérature, nous avons observé que , après internalisation, l'EGFR était dégradé dans les cellules en moins de deux heures¹⁵⁰ (Figure 87). Nous avons vérifié si l'EGF couplé aux nanoparticules avait le même comportement. Nous avons internalisé soit de l'EGF libre, soit le complexe NP-EGF568 dans les cellules. Nous avons observé le signal des récepteurs EGFR après vingt minutes d'incubation : dans les deux cas ils étaient activés et une colocalisation avec le signal des nanoparticules était observée dans le deuxième cas. Après une heure trente minutes d'incubation à 37 °C nous n'avons plus observé les points fluorescents représentatifs de l'internalisation de l'EGFR qui a donc été dégradé (Figure 87).

Localisation d'endosomes magnétiques

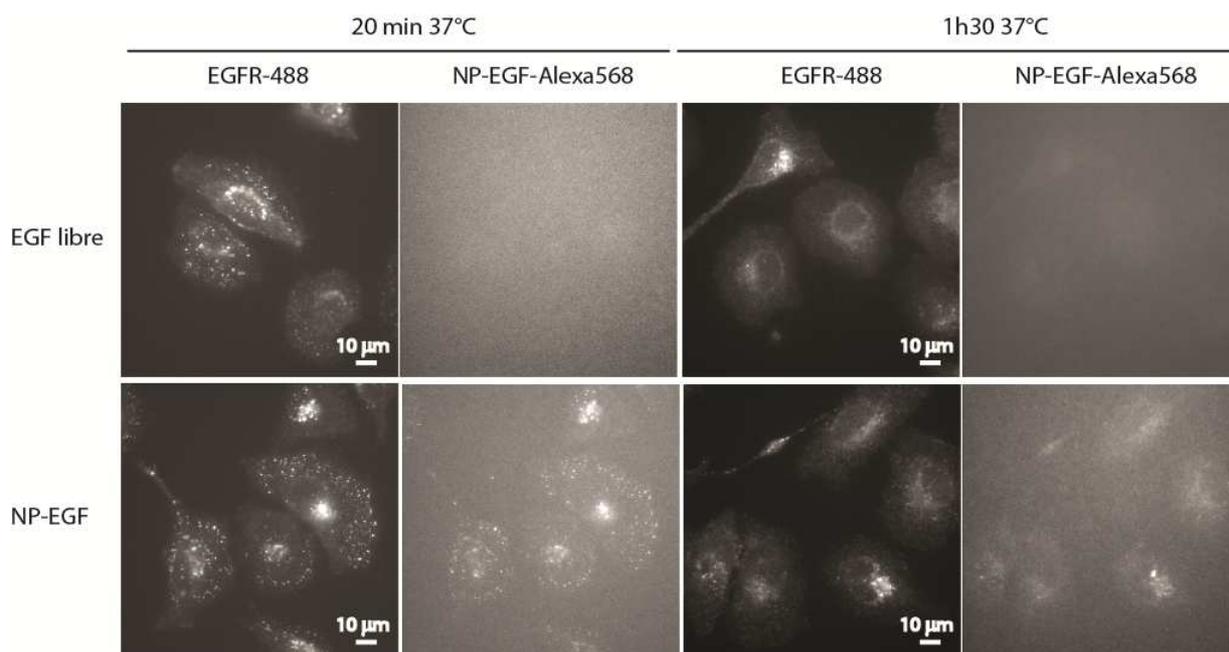


Figure 87 Dégradation de l'EGFR pour de l'EGF libre et couplé aux nanoparticules. Après vingt minutes d'incubation à 37 °C on retrouve une distribution spatiale des signaux de fluorescence au sein des cellules caractéristiques de l'internalisation de l'EGFR dans les deux cas. Après une heure trente, l'EGF est dégradé dans les deux cas.

Ces différents résultats montrent que ce système peut être utilisé pour étudier magnétiquement l'importance de l'information positionnelle sur la signalisation de l'EGF. En effet, nous avons rendu les endosomes magnétiques, sans que cela n'affecte leur signalisation (activation et dégradation).

3. Manipulation magnétique intracellulaire

Nous avons ensuite étudié la possibilité de manipulation intracellulaire d'endosomes magnétiques. Pour cela, nous avons travaillé avec des nanoparticules magnétiques Ademtech de 120 nm fluorescentes (couplées à du PEG-PLL fluorescent).

3.1. Internalisation et mouvement des nanoparticules sans champ magnétique

Les nanoparticules sont internalisées de manière non spécifique dans des cellules HeLa. Elles sont visibles en microscopie de fluorescence (Figure 88).

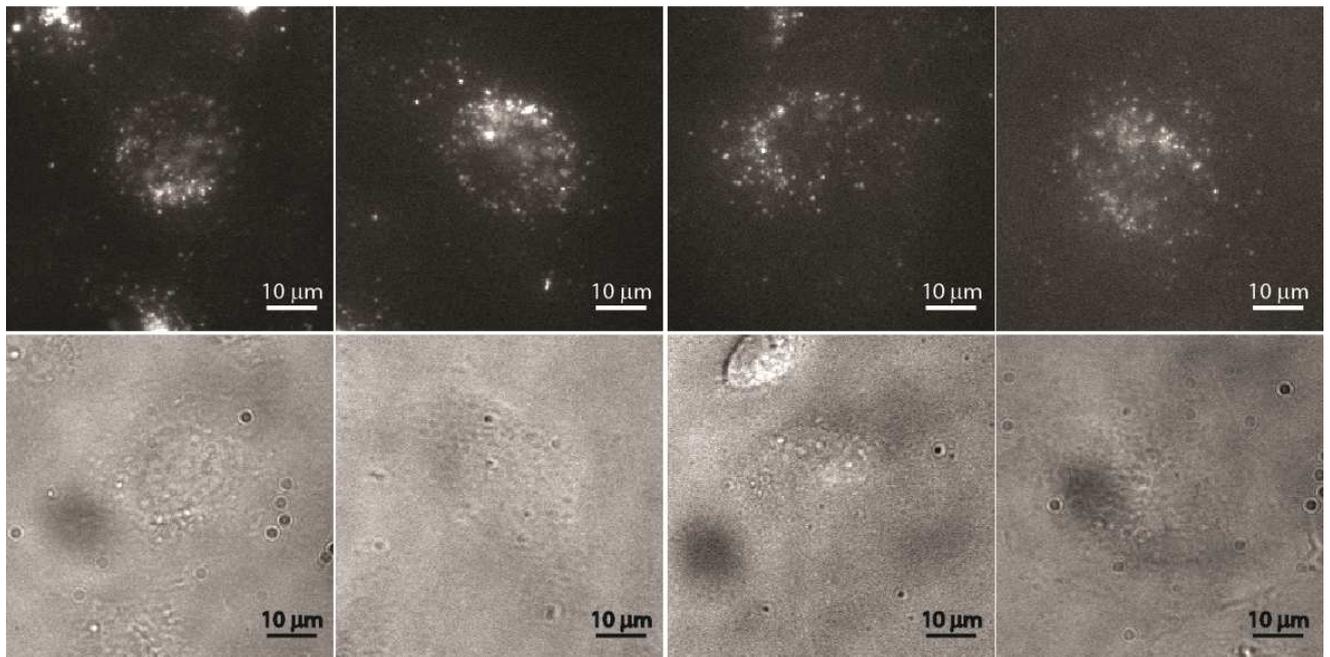


Figure 88 Nanoparticules magnétiques fluorescentes endocytées dans des cellules.

Nous avons étudié pour plusieurs cellules le mouvement de ces endosomes sans champ magnétique. Les trajectoires et les vitesses de déplacement sont représentées sur la figure 89,a, pour un temps d'observation d'environ une minute. Nous avons observé deux types de trajectoire : des nanoparticules que nous pouvons considérer comme immobiles (avec un déplacement inférieur à $0,2 \mu\text{m}$ entre chaque point) et des nanoparticules avec un mouvement beaucoup plus important, quasi linéaire. Ceci nous oriente vers l'hypothèse d'un transport actif par les moteurs moléculaires. Pour le vérifier nous avons traité les cellules avec du nocodazole, une molécule qui favorise la dépolymérisation des microtubules. Nous avons également suivi la trajectoire des endosomes, la majorité était immobile (Figure 89, b).

Localisation d'endosomes magnétiques

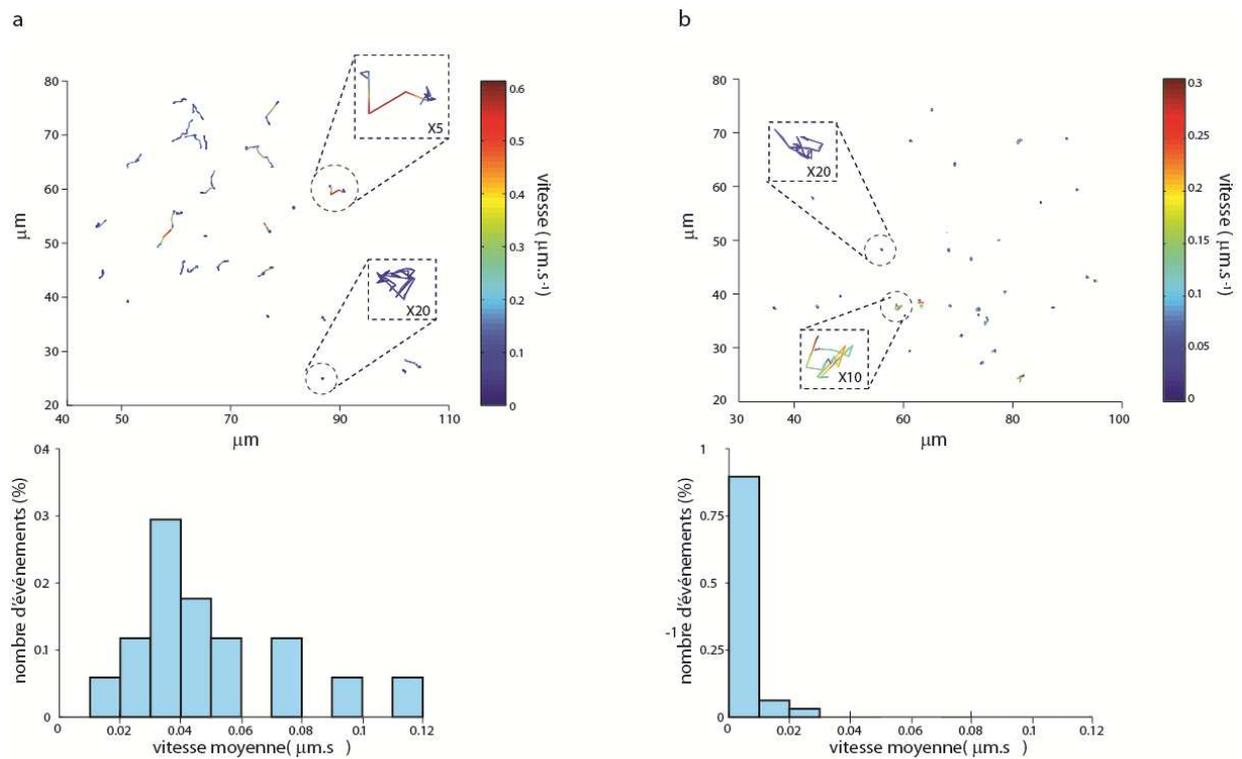


Figure 89 Trajectoires d'endosomes magnétiques. En haut : trajectoires des endosomes avec un pas de trois secondes, deux trajectoires typiques sont zoomées. En bas : histogramme de la vitesse moyenne des endosomes entre le point de départ et le point d'arrivée. a, Cellules contrôles. b, Cellules traitées avec du nocodazole.

Dans les cellules non traitées au nocodazole, le mouvement des endosomes est directionnel. La vitesse des endosomes est comprise entre $0,15$ et $0,6 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui est du même ordre de grandeurs que les vitesses de déplacement d'endosomes magnétiques mesurées dans des études précédentes (Loubéry *et al.* ont mesuré une vitesse de $0,27 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les endosomes précoces et $0,49 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les endosomes tardifs)¹⁵⁶.

3.2. Application d'un gradient de champ en utilisant une pointe magnétique

Les nanoparticules magnétiques que nous utilisons sont des objets superparamagnétiques qui, quand ils sont soumis à un champ magnétique, ressentent une force du type :

$\mu_{x,i} \frac{dB_x}{dx}$, où B_x est le champ magnétique dans la direction x et $\mu_{x,i}$ le moment magnétique.

C'est donc le gradient de champ magnétique qui importe pour nos expériences. Une technique pour obtenir un gradient de champ magnétique élevé est d'utiliser une pointe en matériau aimantable, aimantée par un aimant permanent. Nous avons étiré une pointe en Ni/Fe (70 % fer, 30 % Nickel) (Figure 90) (Voir Méthodes).

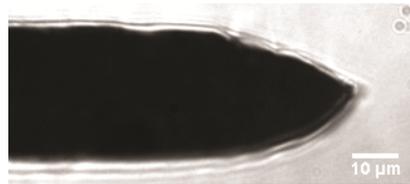


Figure 90 Pointe magnétique

3.2.1. Simulation du gradient de champ magnétique

En utilisant le logiciel FEMM (logiciel qui calcule l'intensité du champ magnétique par une méthode d'éléments finis. <http://www.femm.info/wiki/HomePage>), nous avons déterminé le gradient de champ dans trois configurations. La première est un aimant permanent sans pointe, au niveau d'une des faces Nord ou Sud (Figure 91, a). Nous avons observé que le gradient est le plus fort au niveau de l'intersection entre la face Nord ou Sud et l'une des faces adjacentes. La deuxième configuration est une pointe d'environ 1 mm de longueur (plus petite que l'aimant), placée le long de l'axe Nord-Sud (Figure 91, b). La troisième est une pointe placée sur une face Nord ou Sud (Figure 91, c).

Localisation d'endosomes magnétiques

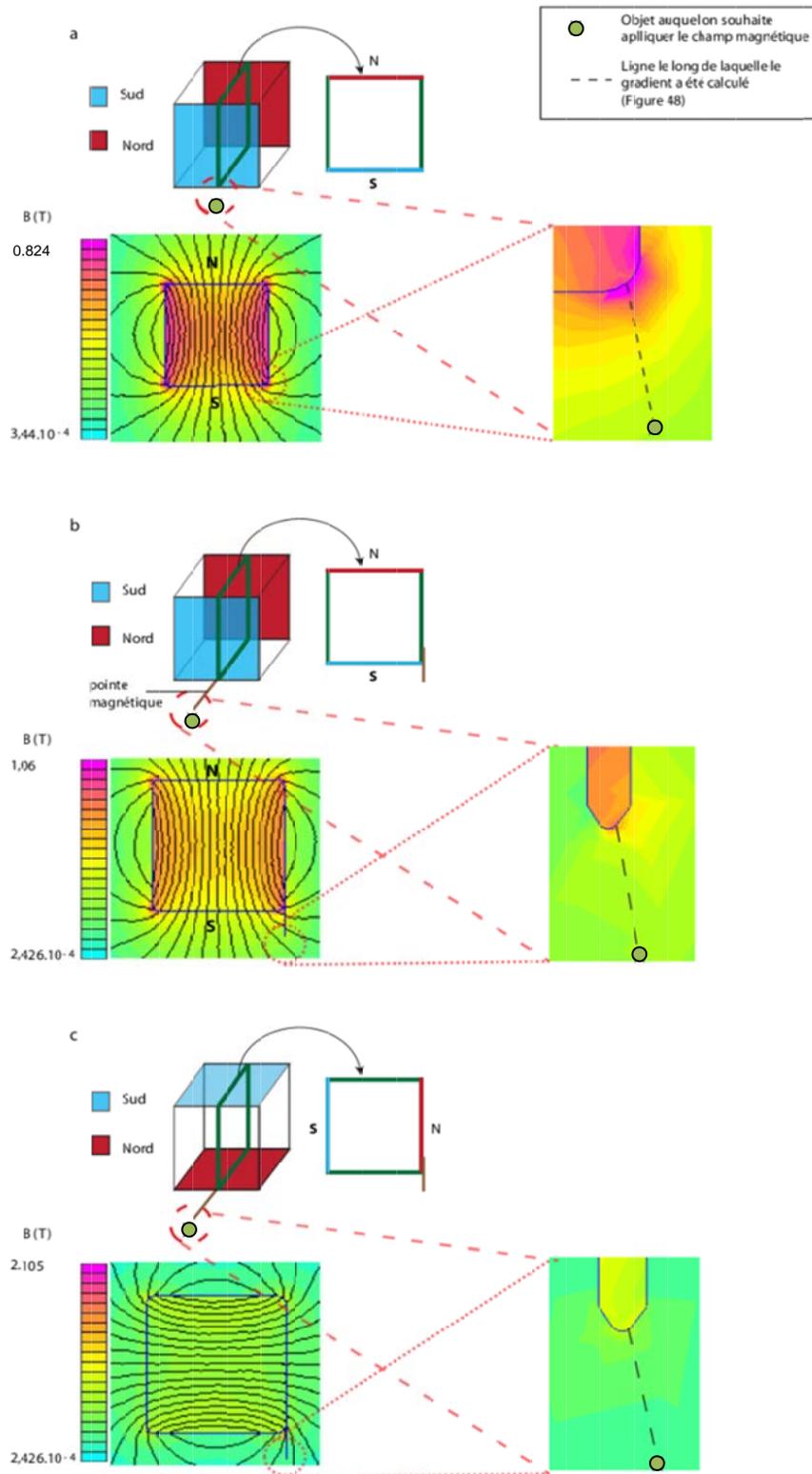


Figure 91 Champ magnétique simulé avec le logiciel FEMM. a, Aimant permanent. b, Pointe placée le long de l'axe Nord-Sud. c, Pointe placée sur une face Nord ou Sud.

Nous avons ensuite extrait des courbes de densité de champ le gradient de champ magnétique pour les trois configurations (Figure 92). Pour les configurations 2 et 3, on a bien une augmentation du gradient de champ très proche de la pointe, avec une valeur de 2.10^3 T.m^{-1} pour l'aimant seul et 4.10^4 T.m^{-1} au voisinage immédiat de la pointe.

Cependant ce gradient de champ décroît très vite : à une vingtaine de micromètres de la pointe le gradient de champ n'est plus que de 8.10^3 T.m^{-1} . Il faut donc être très proche de la pointe pour conserver les bénéfices de ce dispositif. C'est un inconvénient de ce dispositif car cela nécessite de positionner précisément la pointe près d'une cellule et ne permet d'appliquer le champ qu'à une cellule à la fois. Les avantages sont notamment d'augmenter le gradient de champ et de contrôler la direction et la position de celui-ci. Dans nos expériences, nous avons utilisé la configuration 2.

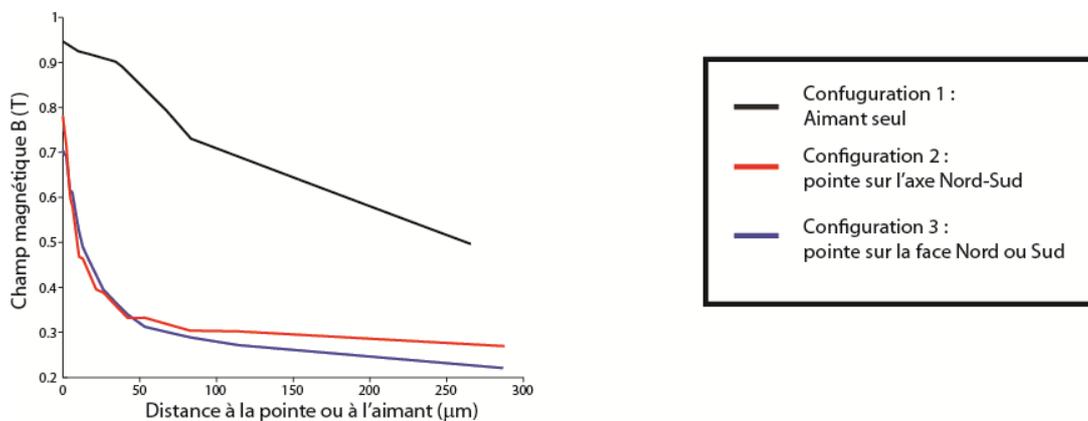


Figure 92 Gradient de champ magnétique au voisinage de la pointe ou de l'aimant. Champ magnétique en fonction de la distance pour les trois configurations.

3.2.2. Caractérisation expérimentale de la pointe

Nous avons mesuré la force appliquée par la pointe sur les nanoparticules magnétiques. Pour cela nous avons dispersé les nanoparticules rendues fluorescentes dans du glycérol et nous avons suivi leur trajectoire vers la pointe. En utilisant la relation de Stokes $F=6\pi\eta rv$, où η est la viscosité du milieu, r le rayon de la particule et v la vitesse instantanée, on peut déduire de ces acquisitions la force appliquée sur les nanoparticules. Nous avons fait cette expérience pour cinq pointes différentes.

Localisation d'endosomes magnétiques

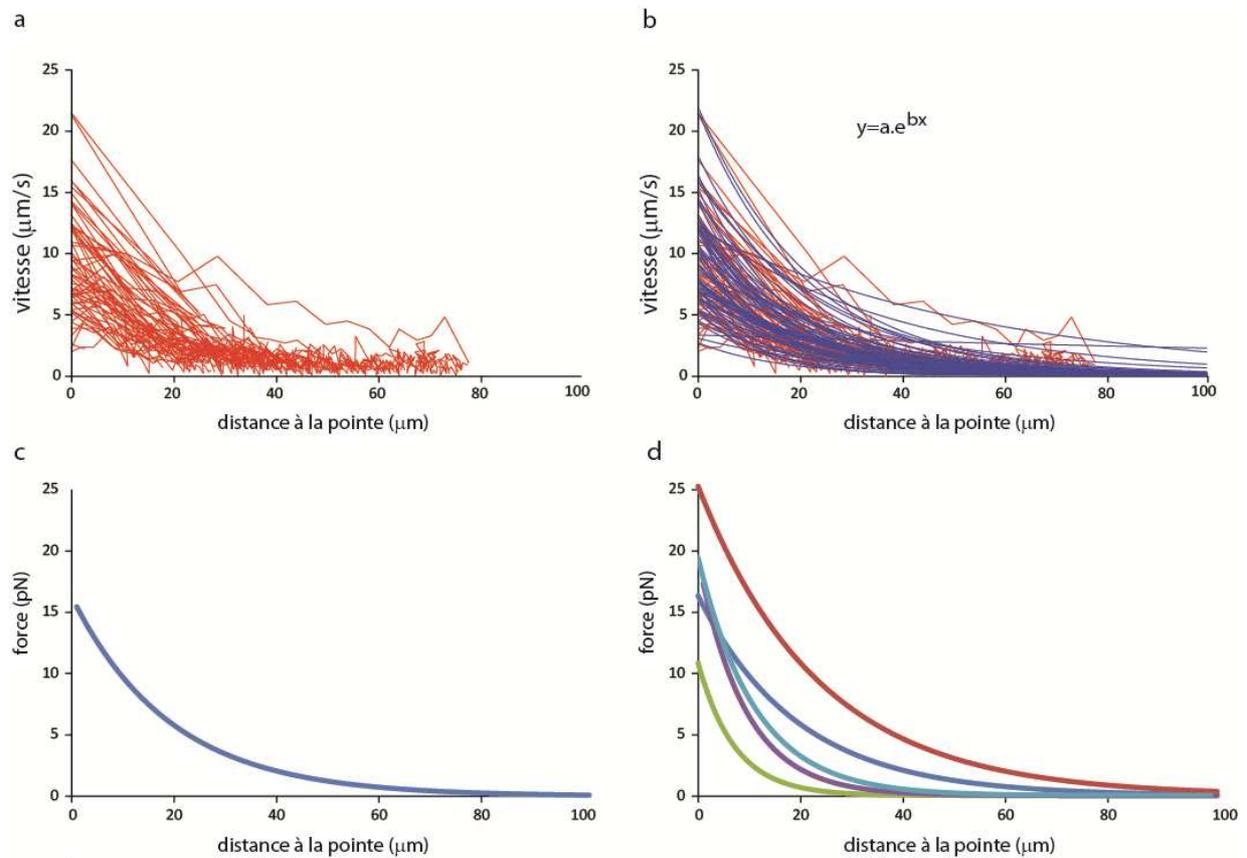


Figure 93 Calibration de la pointe magnétique. a, Vitesse de particules magnétiques de 120 nm de diamètre quand elles s'approchent de la pointe. b, Ajustement des courbes par une fonction du type $y = a \cdot e^{bx}$. c, Force moyenne exercée sur les nanoparticules en fonction de la distance à la pointe. d, Comparaison de la force moyenne pour cinq pointes.

Nous remarquons sur la figure 93,a que, pour une même pointe, les vitesses instantanées des nanoparticules sont assez dispersées. Cela peut être dû à une dispersion du diamètre initial des nanoparticules, à un phénomène d'agrégation des nanoparticules durant le couplage ou encore à une hétérogénéité du gradient de champ sur la pointe elle-même (Figure 91). Nous avons ajusté les courbes par une fonction du type ' $y = a \cdot e^{bx}$ ' (Figure 93, b), puis nous les avons moyennées pour obtenir la force moyenne appliquée par cette pointe sur les nanoparticules (Figure 93, c). La même procédure a été appliquée aux autres pointes (Figure 93, d). La force moyenne présente une certaine variabilité suivant les pointes, soulignant l'importance de la fabrication de la pointe (voir Méthodes).

3.3. Application aux transports magnétiques d'endosomes

3.3.1. Etudes de trajectoires d'endosomes magnétiques

Nous avons utilisé ce montage pour étudier le mouvement d'endosomes magnétiques soumis à un champ (Figure 94)

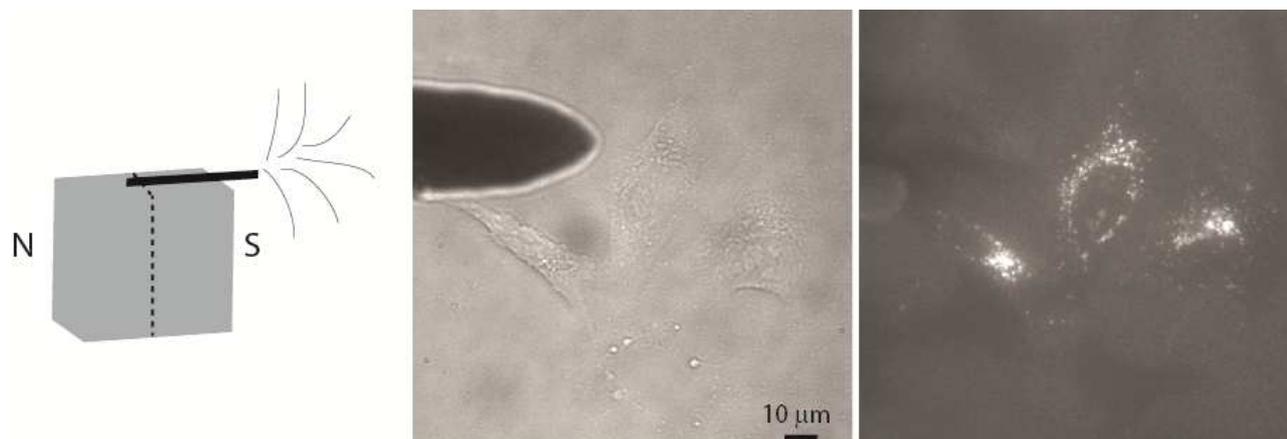


Figure 94 Manipulation d'endosomes par une pointe magnétique.

Dans certaines cellules soumises au champ magnétique, nous avons observé un mouvement des endosomes vers la pointe, comme nous pouvons le voir sur les figures 95 et 96.

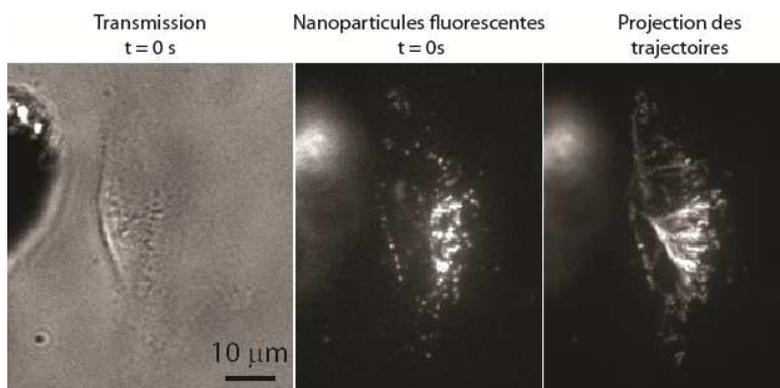


Figure 95 Exemple de mouvement d'endosomes dans une cellule Hela. Le temps total d'acquisition est de cinquante minutes.

Localisation d'endosomes magnétiques

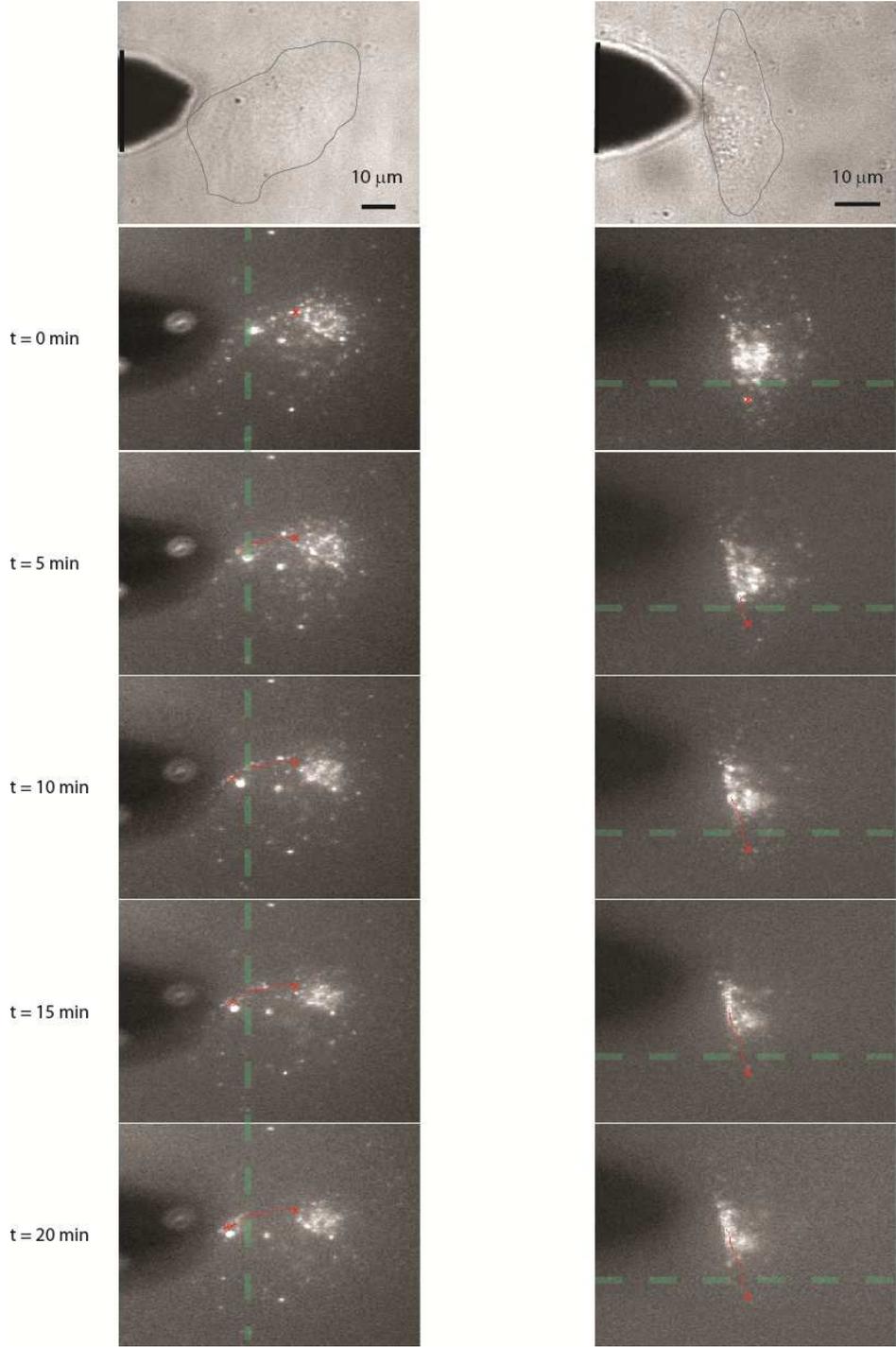


Figure 96 Deux exemples de manipulation magnétique d'endosomes. La ligne rouge représente la trajectoire d'un endosome particulier. La ligne verte sert de repère pour suivre le mouvement d'ensemble dans la cellule.

Localisation d'endosomes magnétiques

Nous avons réalisé cette expérience sur 111 cellules, dans 26 d'entre elles, nous avons observé un mouvement clair des endosomes vers la pointe, c'est-à-dire dans 23% des cas. Nous avons suivi le mouvement des endosomes dans ces 26 cellules (une image toutes les trente secondes). Nous avons suivi la trajectoire de 75 endosomes dans ces cellules. Plusieurs trajectoires n'ont pu être analysées pour deux raisons principales : nous avons souvent observé un mouvement d'ensemble dans la cellule, qui ne nous a pas permis de différencier plusieurs endosomes, et la qualité optique a rendu difficile l'analyse de certaines trajectoires que nous avons alors éliminées de nos statistiques. Les résultats sont représentés sur la figure 97.

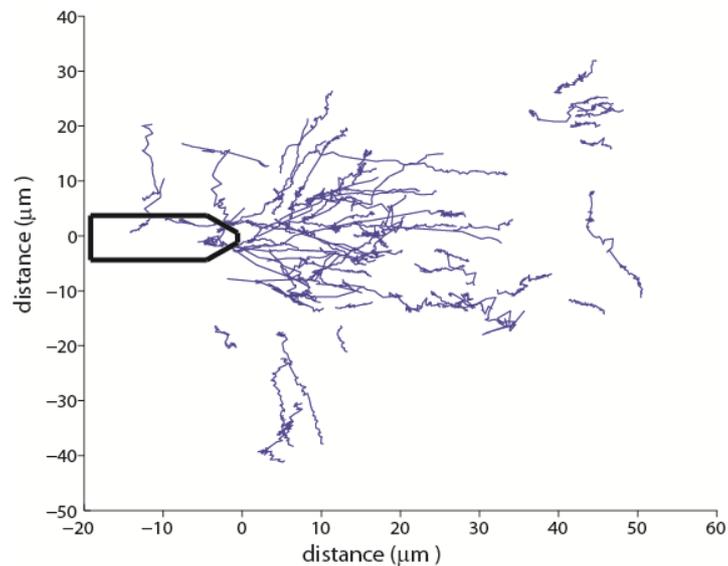


Figure 97 Trajectoires des endosomes magnétiques vers la pointe. N1 = 75 endosomes, N2 = 26 cellules

La vitesse moyenne des endosomes est comprise entre $0,001$ et $0,075 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, des vitesses inférieures à celle de transport des endosomes par les moteurs moléculaires (Figure 98, a).

Nous avons représenté cette vitesse moyenne en fonction de la distance initiale à la pointe (Figure 98, b). La force magnétique n'a pas été suffisante pour attirer des endosomes situés initialement à une distance supérieure à $60 \mu\text{m}$ de la pointe, en accord avec la forte décroissance de la force magnétique en fonction de la distance prévue par la calibration de la pointe.

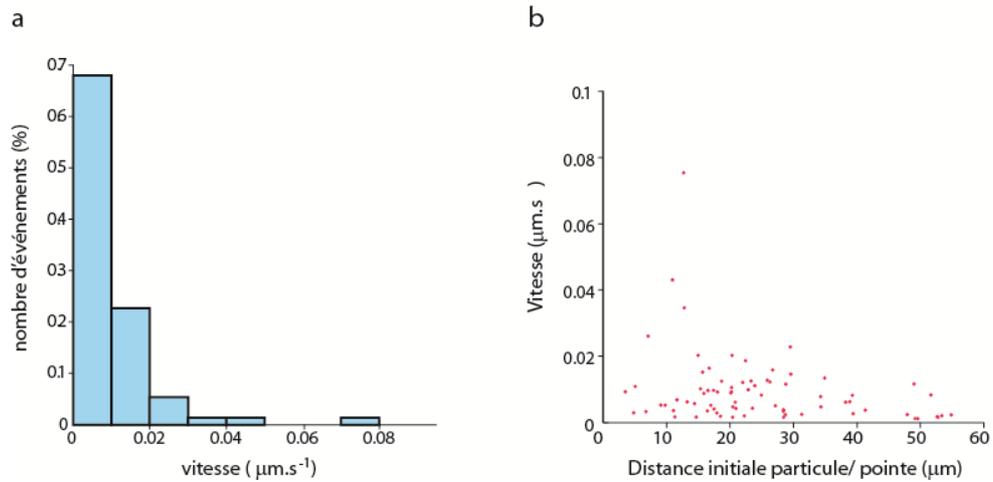


Figure 98 a, Histogramme des vitesses moyennes des endosomes. b, Vitesse moyenne des endosomes en fonction de la distance initiale endosome/ pointe magnétique.

Pour comprendre ces résultats nous avons représenté sur la figure 99 les trajectoires et la vitesse instantanée d'endosomes magnétiques pour deux cellules données.

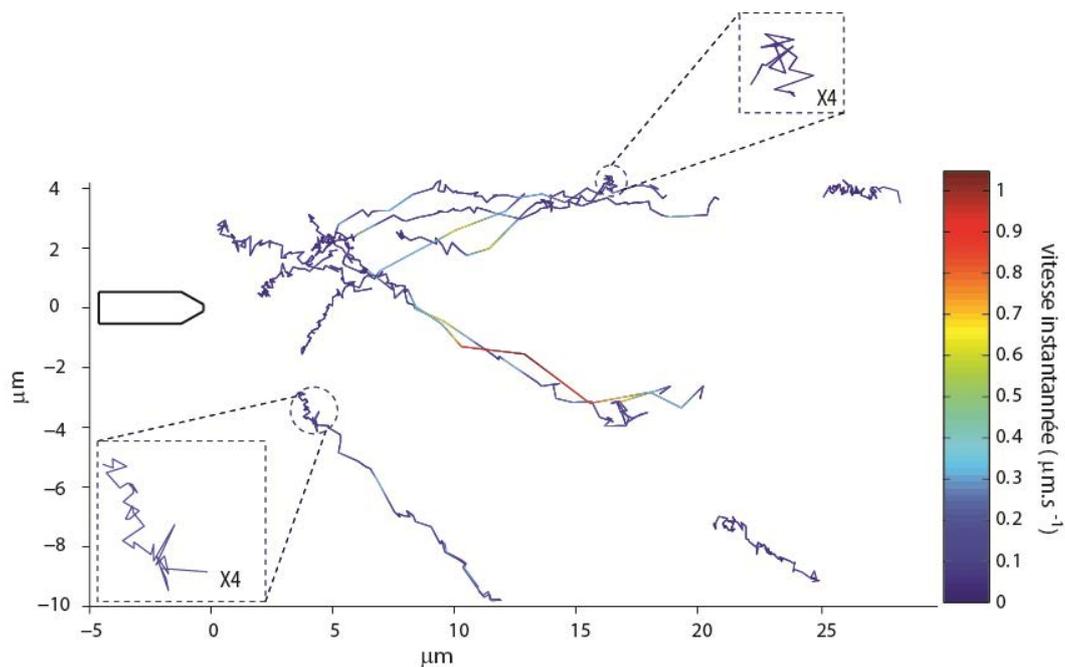


Figure 99 Exemple de trajectoires pour deux cellules données.

La vitesse est irrégulière le long de la trajectoire et le transport semble se faire par « sauts ». Ainsi pour les 26 cellules analysées, la vitesse maximale sur chaque trajectoire d'endosome est comprise entre 0,15 et 3,7 μm.s⁻¹ (Figure 100), c'est-à-dire une vitesse bien supérieure à la vitesse moyenne des endosomes initialement déterminée (Figure 98).

Localisation d'endosomes magnétiques

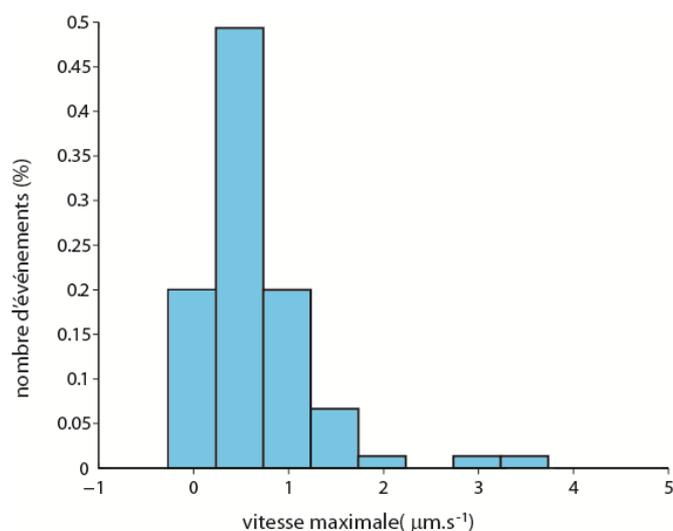


Figure 100 Histogramme de la vitesse maximale pour chaque trajectoire d'endosome. N1 = 75 endosomes, N2 = 26 cellules.

La vitesse des endosomes n'est donc pas régulière tout au long du mouvement. On remarque notamment qu'elle semble plus faible au début et à la fin du mouvement (Figure 99).

Le ralentissement de la vitesse en fin de mouvement correspond à l'arrivée des endosomes contre la membrane plasmique. De plus, ce ralentissement est souvent corrélé à une déformation locale de la membrane dont quelques exemples sont donnés figure 101.

Localisation d'endosomes magnétiques

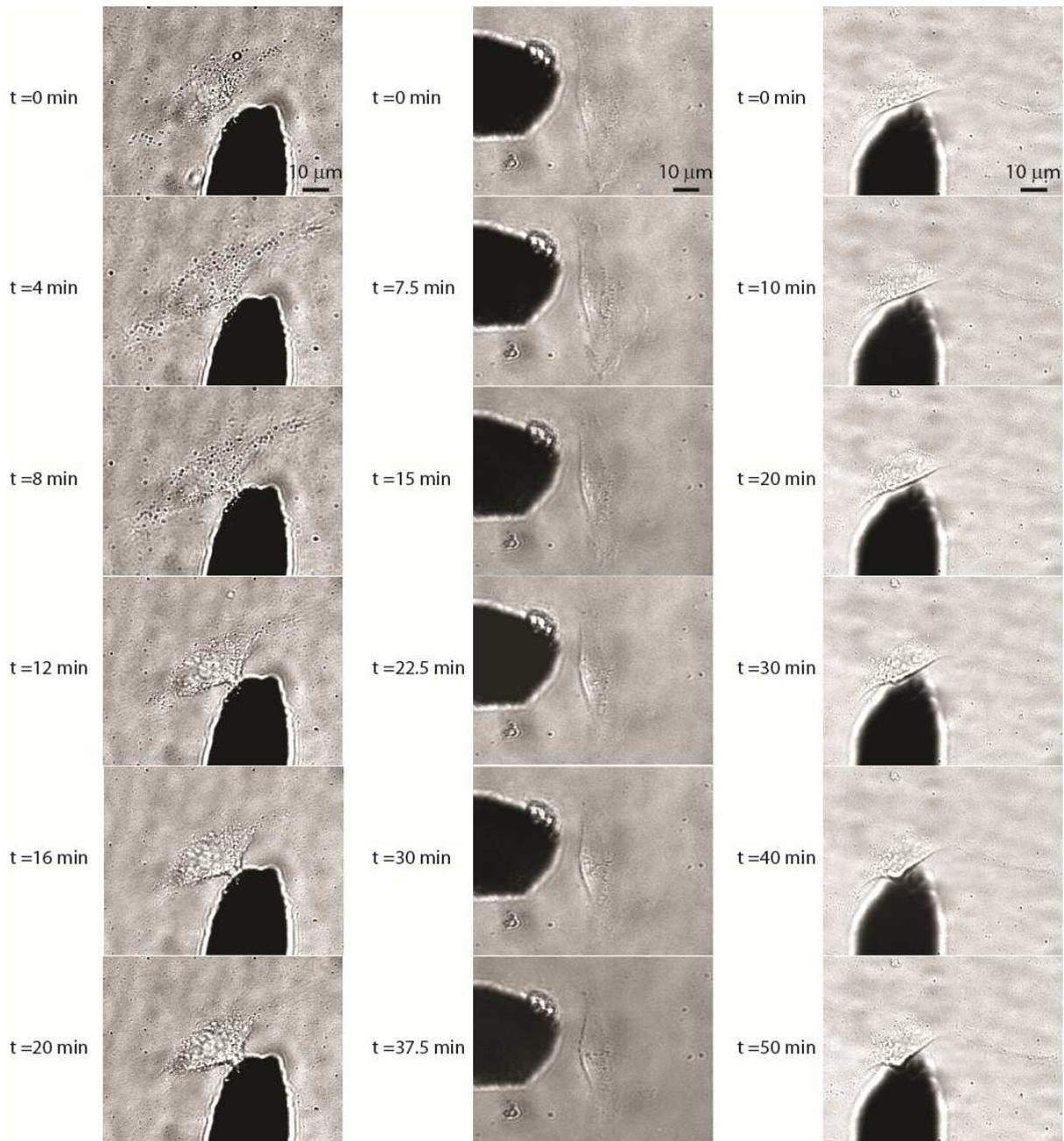


Figure 101 Exemple de déformation de la membrane cellulaire due à la force exercée par les endosomes.

La faible vitesse au début de la trajectoire (Figure 99) est peut-être due aux propriétés du cytosquelette. Les nanoparticules pourraient être contraintes par les microfilaments d'actine ou les microtubules. Pour étudier cela nous avons utilisé des molécules permettant de perturber l'actine et les microtubules.

3.3.2. Influence du réseau d'actine sur le transport magnétique des endosomes

Nous avons fait subir aux cellules, après endocytose, un traitement à la cytochalasine-D, une molécule perturbe la polymérisation de l'actine. Avec le traitement à la cytochalasine-D, nous avons observé un mouvement des endosomes magnétiques vers la pointe dans 18 cellules sur 53, c'est-à-dire 34%, à comparer aux 22% dans le cas sans cytochalasine-D. Nous avons représenté ces résultats sur la figure 102. Quelques endosomes que nous avons pu suivre dans les cellules traitées à la cytochalasine-D sont légèrement plus rapides que pour les cellules contrôles, mais la vitesse moyenne des endosomes reste du même ordre de grandeur. Nous avons également pu attirer des endosomes initialement plus éloignés de la pointe que pour le cas sans cytochalasine-D (80 μm , contre 60 μm pour le contrôle).

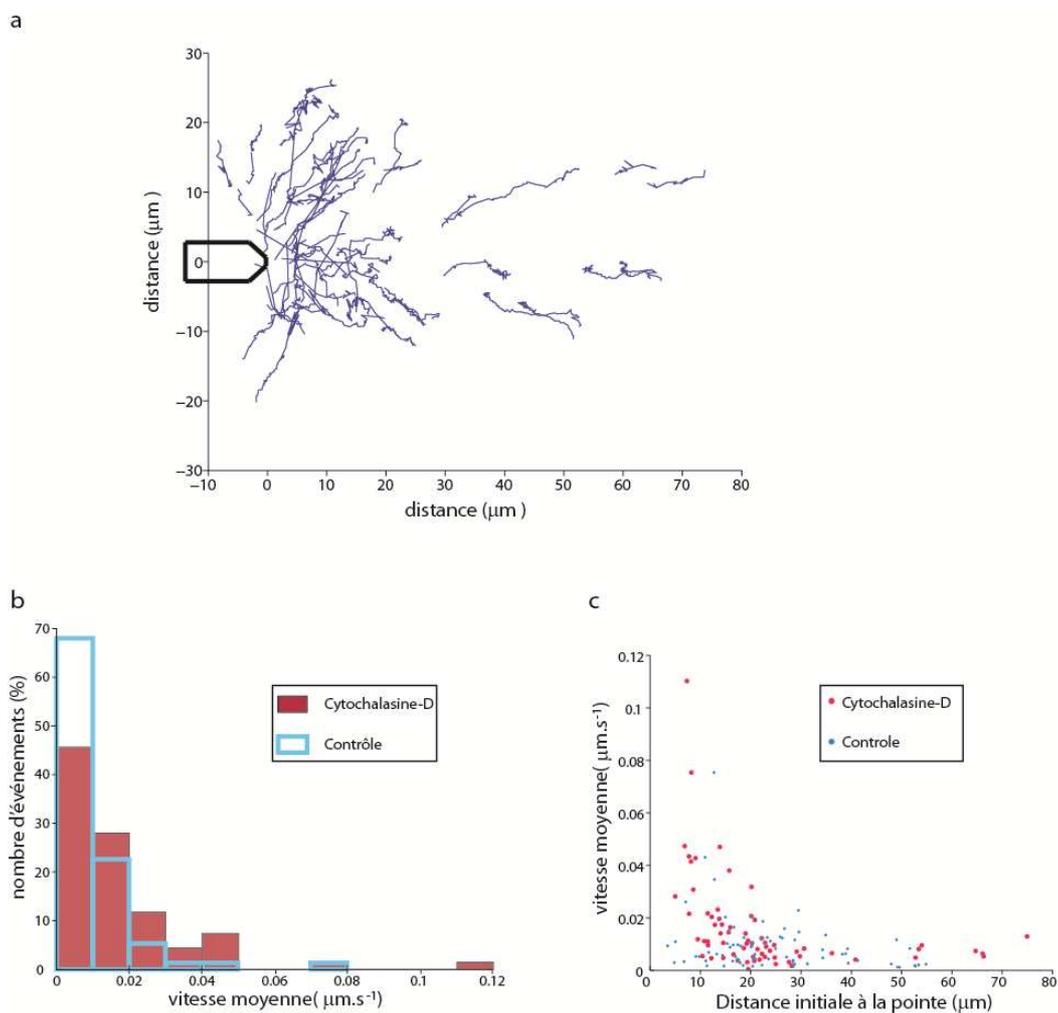


Figure 102 a, Histogramme des vitesses moyennes des endosomes. b, Vitesses moyennes des endosomes en fonction de la distance initiale endosome/pointe.

Localisation d'endosomes magnétiques

Il en est de même pour la vitesse maximale sur chaque trajectoire qui est comprise entre $0,16$ et $4,4 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ($0,15$ et $3,7 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les cellules contrôles) avec 50% des endosomes ayant une vitesse maximale comprise entre $0,25$ et $0,75 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (vitesse comparable à la vitesse de transport par les moteurs moléculaires) comme pour les cellules non traitées à la cytochalasine-D (Figure 103).

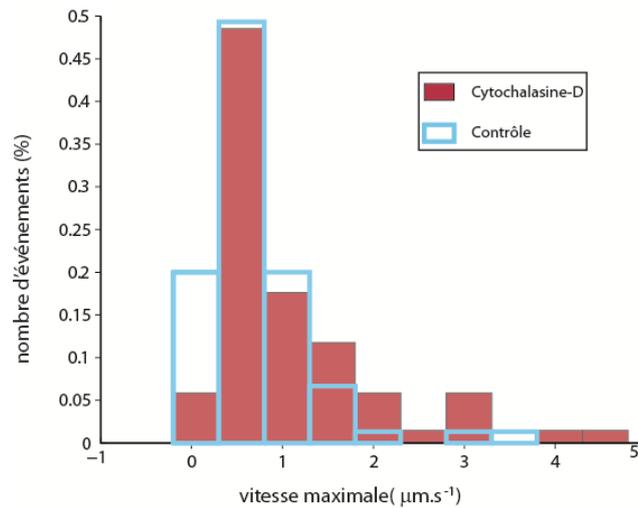


Figure 103 Histogramme de la vitesse maximale pour chaque trajectoire pour des cellules traitées ou non à la cytochalasine-D.

Nous avons également observé des déformations plus ou moins importantes des cellules (Figure 104).

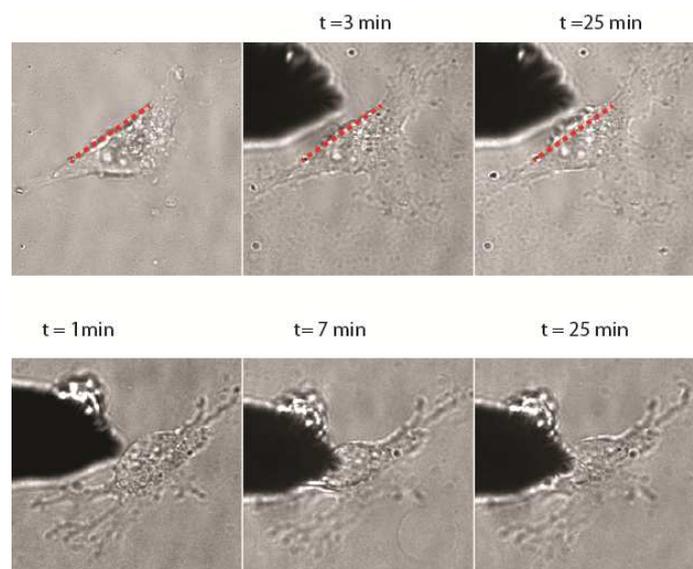


Figure 104 Exemples de déformation des cellules sous champ magnétique

Localisation d'endosomes magnétiques

Les microfilaments d'actine ne semblent pas avoir une influence notable sur le transport magnétique des endosomes dans notre cas.

Nous avons ensuite testé le rôle des microtubules en travaillant avec des cellules traitées par du nocodazole, une molécule qui perturbe la polymérisation des microtubules.

3.3.3. Influence des microtubules sur le transport magnétique des endosomes

Nous avons fait subir aux cellules, après endocytose, un traitement au nocodazole. Nous avons observé un mouvement des endosomes vers la pointe dans deux des trois cellules analysées. Les résultats sont montrés sur la figure 105. Pour les cellules analysées, les vitesses moyennes et les vitesses maximales sont comparables à celles des cellules non traitées. Les microtubules ne semblent pas non plus avoir dans notre cas une influence notable sur le transport magnétique des endosomes.

Localisation d'endosomes magnétiques

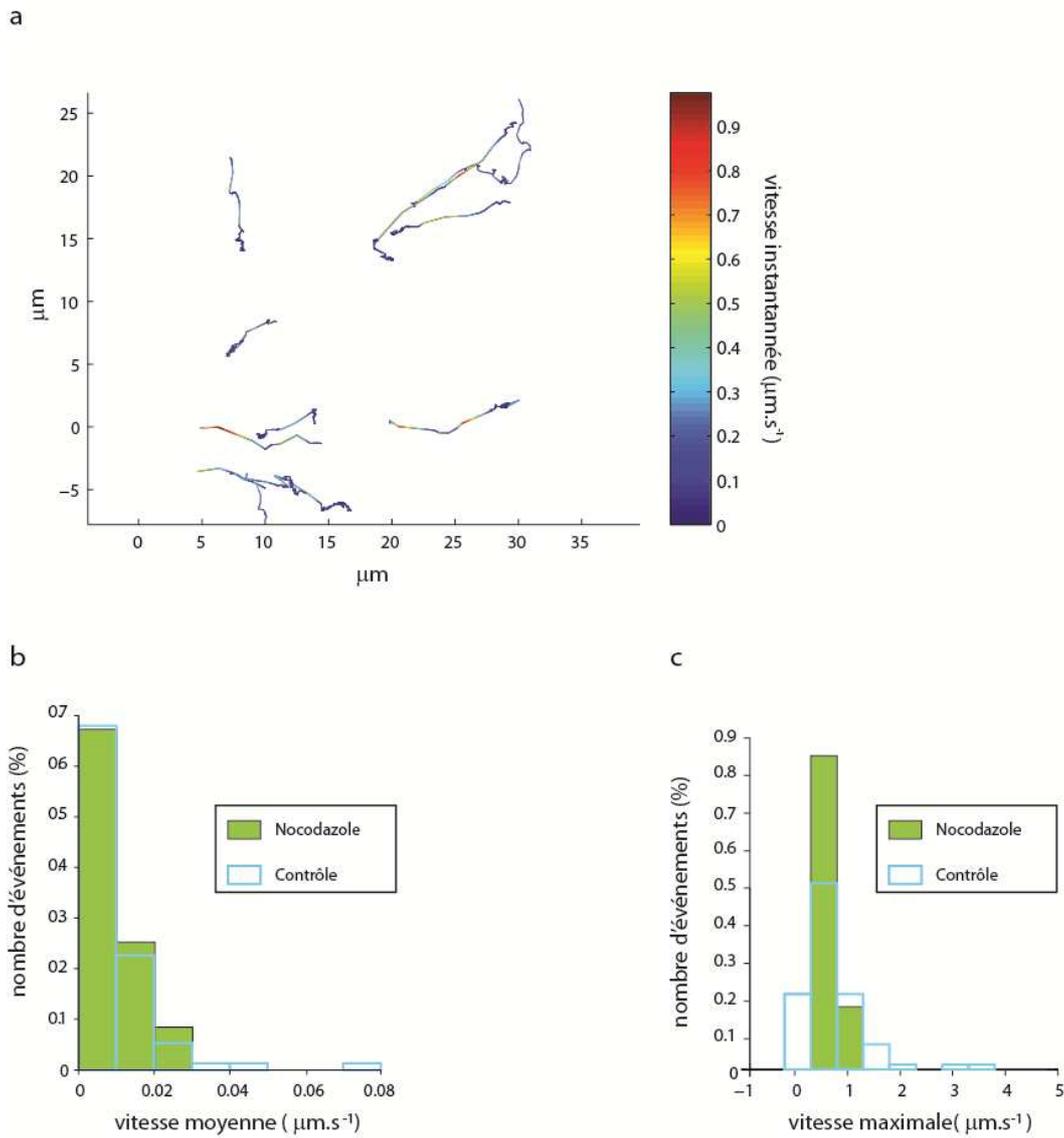


Figure 105 Cellules traitées au nocodazole. a, Trajectoire des endosomes et vitesses instantanées. N1 = 2 cellules, N2 = 12 endosomes. b, Histogramme des vitesses moyennes des endosomes. c, Histogramme des vitesses maximales pour chaque trajectoire d'endosome.

4. Discussion et perspectives

Nos résultats, bien que préliminaires, posent plusieurs questions, concernant l'irrégularité de nos trajectoires, et l'effet très faible de la perturbation des éléments du cytosquelette.

4.1. Discussion sur la méthode de la pointe

4.1.1. Effet de la perturbation du cytosquelette

Etoc *et al.* ont étudié la diffusion de particules de différentes tailles au sein de cellules HeLa et NiH 3t3. Ils ont observé que pour un diamètre supérieur à 75 nm, les particules étaient dans un régime qu'ils ont qualifié d'élastique et qu'ils ont attribué à la taille caractéristique du réseau d'actine¹³². Ils sont ainsi parvenus à asymétriser des nanoparticules de 40 nm dans des cellules. L'état du cytosquelette devrait donc avoir un effet sur la manipulation magnétique d'endosomes. Il a ainsi été montré que la perturbation des éléments du cytosquelette diminuait la viscosité intracellulaire¹⁵⁷. Ainsi Wilhelm *et al.* ont mesuré une viscosité moyenne de 2,1 Pa.s et un temps de relaxation de 0,25 s pour un cytosquelette intact, contre une viscosité moyenne de 0,43 Pa.s et un temps de relaxation de 0,043 s quand les microfilaments d'actine sont perturbés¹⁰⁴. Quand les microtubules sont perturbés, ils ont trouvé une viscosité moyenne de 0,4 Pa.s et un temps de relaxation de 0,048 s. D'après ces résultats, une perturbation du cytosquelette diminue la viscoélasticité du milieu intracellulaire. Nous devrions donc détecter des différences dans les dynamiques avec et sans perturbation, ce qui n'a pas été le cas. Une hypothèse pour expliquer nos observations concerne la déformation de nos cellules. En effet, dans les cellules traitées ou non avec des drogues perturbant le cytosquelette nous avons souvent observé, en plus de la déformation locale de la membrane près de la pointe, une déformation globale de la cellule avec parfois un début de décollement (Figures 101 et 104). Nous appliquons donc sûrement sur nos cellules des forces de déformation et décollement qui influent elles aussi sur la vitesse de déplacement des endosomes. La vitesse des endosomes est donc sûrement le reflet, en plus des propriétés viscoélastiques des cellules, de ces forces. Nous ne pouvons également pas exclure une dépolymérisation seulement partielle de des fibres du cytosquelette.

4.1.2. Irrégularité des trajectoires

Une hypothèse pour expliquer l'irrégularité des vitesses le long des trajectoires concerne l'encombrement cellulaire. L'hétérogénéité du milieu intracellulaire pourrait conduire à perturber le mouvement des endosomes.

Par ailleurs, les cellules sont des objets viscoélastiques. Des mesures de microrhéologie passives ou active ont permis de décrire le milieu intracellulaire avec le modèle de Voigt-Maxwell, représentant les principaux éléments du cytosquelette par leurs propriétés élastique et visqueuse^{103, 106} (Figure 106).

Localisation d'endosomes magnétiques

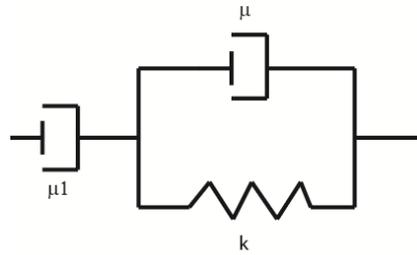


Figure 106 Modèle viscoélastique de la cellule. k est lié à l'élasticité de la cellule, $\mu 1$ à la viscosité du cytosquelette et μ à la viscosité des éléments liquides¹⁵⁸.

Les propriétés viscoélastiques vont dépendre du type cellulaire, mais également de l'endroit où elles sont mesurées dans la cellule¹⁰⁶ (Figure 107).

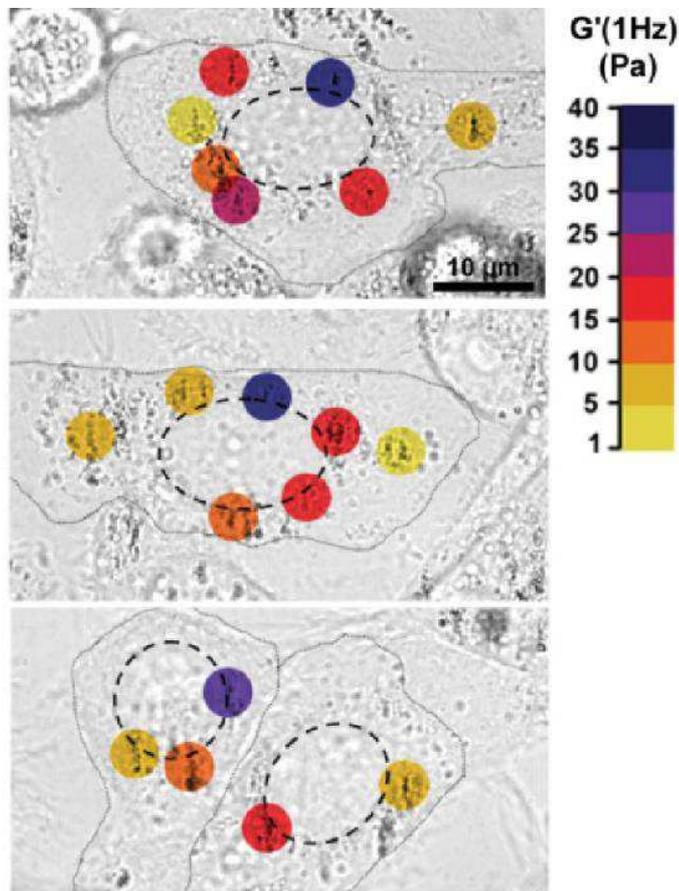


Figure 107 Hétérogénéité de la viscosité intracellulaire pour des cellules tumorales. Tiré de [106].

Pour des cellules HeLa, par exemple, Wilhelm *et al.* ont mesuré une viscosité de 3,2 Pa.s et un temps de relaxation de 0,4 s dans les régions périnucléaires contre une viscosité de 0,4 Pa.s et un

temps de relaxation de 0,05 s plus loin dans le cytoplasme¹⁰⁴. Cette forte hétérogénéité des propriétés viscoélastiques des cellules pourrait expliquer en partie nos résultats.

4.2. Conclusion sur la technique de la pointe magnétique

Les pointes magnétiques que nous avons utilisées nous ont permis de transporter des endosomes dans les cellules, en un temps de l'ordre de la dizaine de minutes, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que la dégradation de l'EGF. Cette méthode pourrait donc nous permettre de délocaliser la signalisation de l'EGF.

Cependant, le faible taux de réussite de nos expériences (22 % pour les cellules non traitées à la cytochalasine-D ou au nocodazole), son application unicellulaire, et les déformations des cellules observées (Figure 101) rendent cette méthode peu prometteuse en l'état pour nos expériences.

4.3. Perspectives

Durant ce projet, nous avons initié un travail intracellulaire dans l'équipe. Nous avons trouvé les conditions pour transporter des endosomes magnétiques dans des cellules adhérentes et mis au point des montages magnétiques.

Ces montages pourront être utilisés dans l'équipe par exemple pour un projet concernant le contrôle magnétique de signaux moléculaires dans des ovocytes de souris dans le but d'étudier le processus de brisure de symétrie au cours de la méiose. Au départ non polarisé, sans asymétrie apparente des déterminants corticaux ou cytoplasmiques, l'ovocyte se polarise très fortement une fois que le fuseau est positionné au cortex, déclenchant alors le processus de division asymétrique. Il a été montré récemment que chez la souris, la migration et le positionnement asymétrique du fuseau méiotique sont indépendants des microtubules mais dépendants de la dynamique d'un réseau d'actine cytoplasmique. Le principe du projet est d'utiliser des nanoparticules couplées à des nucléateurs de l'actine et microinjectées dans des ovocytes pour perturber la concentration locale d'actine corticale ou cytoplasmique, et d'observer s'il est possible de changer la polarité globale de l'ovocyte juste en appliquant une perturbation locale (Figure 108).

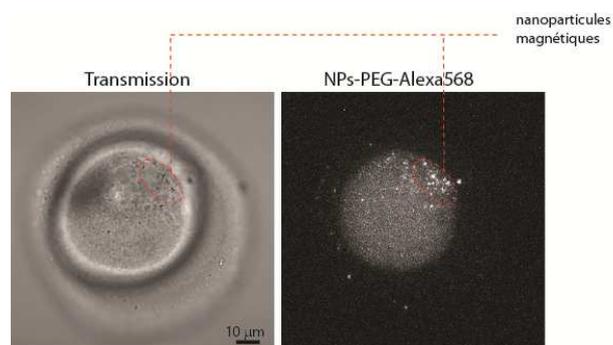


Figure 108 Ovocyte dans lequel des nanoparticules magnétiques fluorescentes ont été injectées.

Localisation d'endosomes magnétiques

Le dispositif de pointe magnétique pourra être utilisé dans ce projet. En effet, du fait de la difficulté à obtenir et injecter des ovocytes, la non parallélisation des expériences n'est pas un problème, au moins pour le début du projet. De plus les ovocytes sont plus épais que les cellules et avec une forme ovoïde bien définie, il devrait donc être plus facile de placer une pointe à une distance contrôlée de ceux-ci. Et enfin, l'injection des nanoparticules devrait permettre d'utiliser des nanoparticules de diamètre plus grand, et donc d'en injecter moins tout en ayant une force magnétique plus importante.

Dans le cas des cellules HeLa, les perspectives possibles sont sur une amélioration de la parallélisation et un meilleur contrôle de la reproductibilité de nos montages magnétiques. Elles reposent peut-être sur la micro-fabrication, dans une étude récente Di Carlo et *al.* ont ainsi fabriqué un montage permettant la manipulation d'endosomes magnétiques dans des cellules HeLa¹⁵⁹. Des aimants micrométriques sont disposés au voisinage de motifs de fibronectine, sur lesquels les cellules adhèrent. Ce dispositif permet un contrôle précis de la force appliquée, en contrôlant la distance aimant/motif de fibronectine. Les motifs de fibronectine pourraient également éviter les problèmes de déformation et de décollement que nous avons eus, car les cellules ont une forme déterminée et ne sont pas trop étalées (Figure 109).

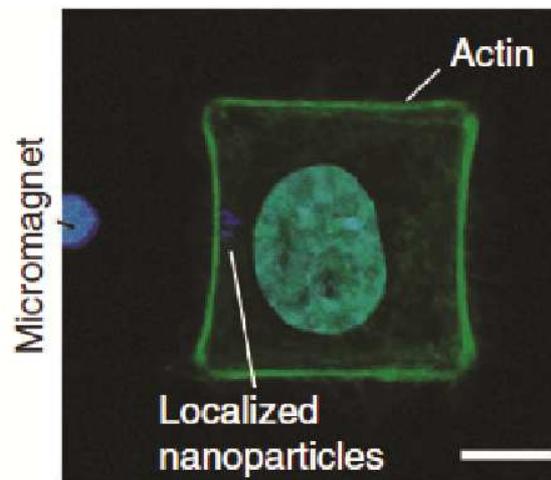


Figure 109 Dispositif microfabriqué permettant de contrôler la distribution de nanoparticules dans une cellule. Tiré de [159].

Localisation d'endosomes magnétiques

Conclusion générale

La localisation des protéines de signalisation dans l'espace intracellulaire est déterminante pour un grand nombre de fonctions cellulaires. L'objectif principal de cette thèse a été de mettre au point des méthodes pour étudier cette localisation, essentiellement à l'aide de nanoparticules magnétiques.

Le premier projet avait pour but d'étudier l'influence d'un gradient de protéines de signalisation sur des éléments du cytosquelette. Nos résultats ont tout d'abord démontré que l'utilisation de nanoparticules magnétiques permet de générer un gradient de protéines de signalisation. Nous avons travaillé dans un système modèle, l'extrait cellulaire de Xénope, ce qui nous a permis de nous affranchir des difficultés d'internalisation de nanoparticules. Nous avons montré qu'un gradient de RanGTP rétroagissait sur la position d'asters de microtubules dans un extrait cellulaire de Xénope confiné. Ces résultats montrent comment des informations positionnelles du cytosquelette peuvent être codées dans la distribution spatiotemporelle d'une protéine de signalisation. Les perspectives de ce travail sont nombreuses et concernent par exemple l'étude d'organisations plus complexes comme le fuseau mitotique assemblé en extrait cellulaire.

Le deuxième projet a consisté à mettre au point des outils pour étudier la localisation d'endosomes de signalisation dans des cellules HeLa. L'objectif a été de tester si la perturbation de la localisation spatiotemporelle des endosomes modifie le devenir des protéines internalisées. Nous avons mis au point un système modèle basé sur l'internalisation et la dégradation de récepteurs EGFR, induites par le ligand EGF couplé à des nanoparticules magnétiques. Nous avons trouvé les conditions pour transporter des endosomes magnétiques dans des cellules adhérentes.

Après avoir utilisé le champ magnétique pour localiser des protéines de signalisation, nous avons testé l'utilisation de systèmes biologiques pour confiner des protéines. Le confinement a été ici induit par la dynamique d'un réseau de filaments d'actine en contraction. Les résultats très préliminaires de ce projet sont présentés en annexe.

Conclusion générale

Annexe : Flux d'actine pour contrôler la nucléation des microtubules

1. Motivations.....	118
2. Caractérisation de l'anneau d'actine	119
2.1. Rayon de l'anneau : augmentation locale de la concentration	119
2.2. Transport induit par l'anneau d'actine	120
2.3. Perturbation de la formation de l'anneau	121
3. Formation d'asters induite par RanQ69L.....	122
3.1. Assemblage des asters.....	122
3.2. Conservation des propriétés de signalisation de RanQ69L en extrait non encapsulé dans des gouttes	124
4. Nucléation des microtubules induite par la contraction de l'actine	125

1. Motivations

Les cascades de signalisation peuvent être régulées par l'hétérogénéité en concentration induite par les nombreuses organisations subcellulaires présentes au sein des cellules. Dans le cytoplasme par exemple, les protéines d'échafaudages, impliquées dans la cascade de phosphorylation des MAPK, vont assurer le recrutement local de kinases, augmentant localement leur concentration¹⁶⁰. Au niveau de la membrane plasmique, des radeaux lipidiques créent des zones dans lesquelles la concentration en protéines diffère du reste de la cellule. Par exemple, dans la signalisation des tyrosines kinases, les radeaux lipidiques servent de « plateforme de concentration ». Les récepteurs peuvent être activés par dimérisation ou encore protégés des phosphatases¹⁶¹. Un réseau d'actine contractile réticulé par la myosine sert « d'échafaudage » à ces radeaux et permet de les stabiliser ou de les agréger¹⁶².

En nous inspirant de ces différentes régulations de la signalisation par confinement, nous avons voulu étudier la possibilité de contrôler la signalisation, non plus magnétiquement, mais en utilisant un changement de concentration induit par les propriétés dynamiques du réseau d'actine. Ainsi, un flux d'actine apparaît spontanément dans de l'extrait cellulaire de Xénope confiné dans des gouttes¹²⁹. En l'absence de confinement, les filaments d'actine s'organisent spontanément en un réseau homogène en quelques minutes (Figure 110, a). Pinot *et al.* ont observé que quand l'extrait est encapsulé dans une goutte, un flux centripète d'actine apparaît, conduisant à la formation d'un anneau d'actine¹²⁹ (Figure 110, a).

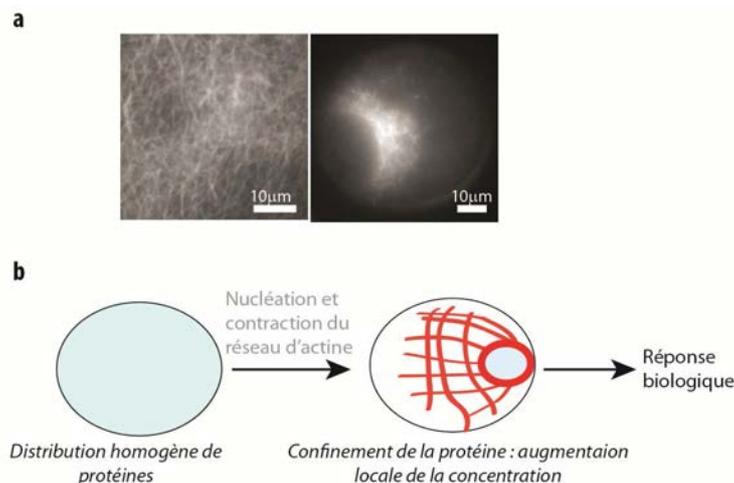


Figure 110 Confinement de protéines induit par un flux d'actine F. a, Réseau d'actine non confiné (gauche) ou encapsulé dans une goutte (droite). Le confinement entraîne la formation d'un anneau d'actine. b, Principe de l'expérience : le flux d'actine entraîne un confinement de la protéine de signalisation et un saut local de concentration

Nous avons tiré parti de cette propriété de l'actine pour induire un confinement de protéines, et donc un saut de concentration. Le principe général est expliqué sur la figure 110, b. Sans réseau

d'actine les protéines sont distribuées de manière homogène dans la goutte. Quand le réseau d'actine se crée et se contracte, les protéines sont transportées et confinées dans l'anneau, conduisant à une augmentation locale de la concentration.

Pour valider cette hypothèse de confinement de protéines nous avons appliqué ce principe à la cascade de RanGTP, qui a une activité dépendant fortement de sa concentration locale.

2. Caractérisation la contraction du réseau d'actine

2.1. Augmentation locale de la concentration

Nous avons tout d'abord étudié la taille de l'anneau d'actine formé après contraction. Nous avons remarqué, en accord avec Pinot et *al.*, que le diamètre de l'anneau mesurait le tiers de celui de la goutte (Figure 111).

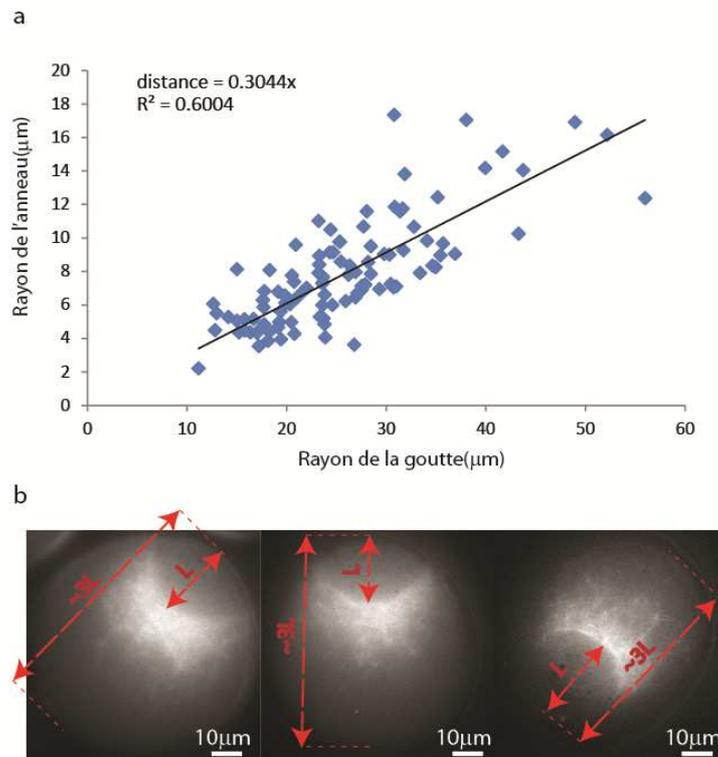


Figure 111 Caractérisation de l'anneau : dimension. a, Rayon de l'anneau d'actine en fonction du rayon de la goutte. b, Exemples de gouttes contenant un anneau d'actine. Les microfilaments d'actine sont observés avec de l'utrophine fluorescente.

Ainsi des protéines confinées dans l'anneau d'actine seraient théoriquement dans un volume 27 fois plus petit que la goutte entière, ce qui donne une augmentation de concentration théorique importante.

2.2. Transport induit par l'anneau d'actine

En utilisant un marqueur de membrane fluorescent nous avons observé que le flux d'actine pouvait transporter des organelles lors de la formation de l'anneau (Figure 112).



Figure 112 Transport d'organelles par le flux d'actine. Les microfilaments d'actine sont observés avec de l'utrophine fluorescente. Les organelles sont observées avec un marqueur de membrane.

Cependant nous avons observé le flux d'actine n'était pas suffisant pour transporter des protéines fluorescentes. Cela suggère que les objets doivent avoir une taille minimale pour être transportés. Nous avons donc développé une stratégie pour confiner une protéine dans l'anneau d'actine. Des nanoparticules pourraient être utilisées comme vecteur de transport de la protéine. Dans l'hypothèse où des nanoparticules seraient transportées par le flux d'actine, des protéines greffées à ces nanoparticules seraient confinées dans l'anneau d'actine, conduisant à un saut local de concentration. (Figure 113).

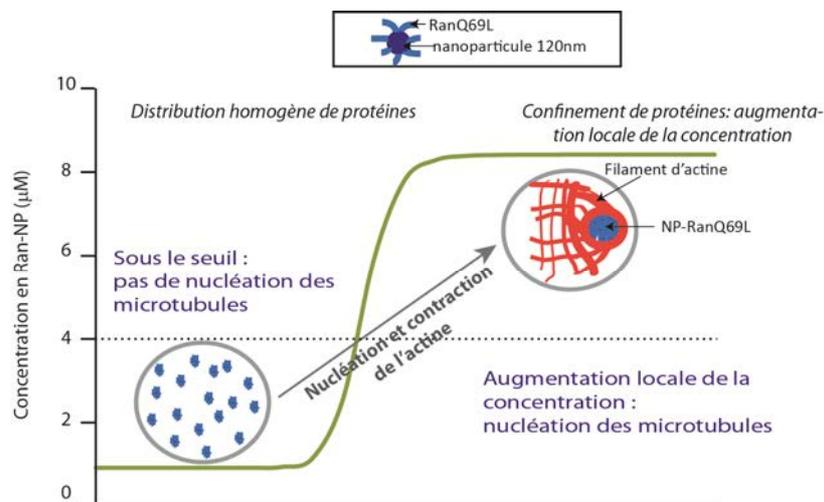


Figure 113 Utilisation de nanoparticules comme vecteur des protéines. Des nanoparticules couplées à la protéine RanQ69L sont introduites dans l'extrait et encapsulées dans des gouttes. Le flux d'actine transporte les nanoparticules et les concentre dans l'anneau, conduisant à un saut local de concentration.

Nous avons donc étudié l'accumulation de nanoparticules dans l'anneau d'actine et notamment l'effet de la taille des nanoparticules. Nous avons testé plusieurs nanoparticules avec un diamètre allant de 50 nm à 300 nm. Nous avons observé une accumulation de nanoparticules au sein de l'anneau d'actine à partir d'un diamètre de 120 nm (Figure 114, a).

Nous avons ensuite étudié la dynamique de transport pour des nanoparticules de 120 nm de diamètre. Sur la figure 114,b nous avons représenté une dynamique temporelle de l'accumulation des nanoparticules dans l'anneau d'actine. Après six minutes, toutes les nanoparticules sont regroupées par le flux d'actine.

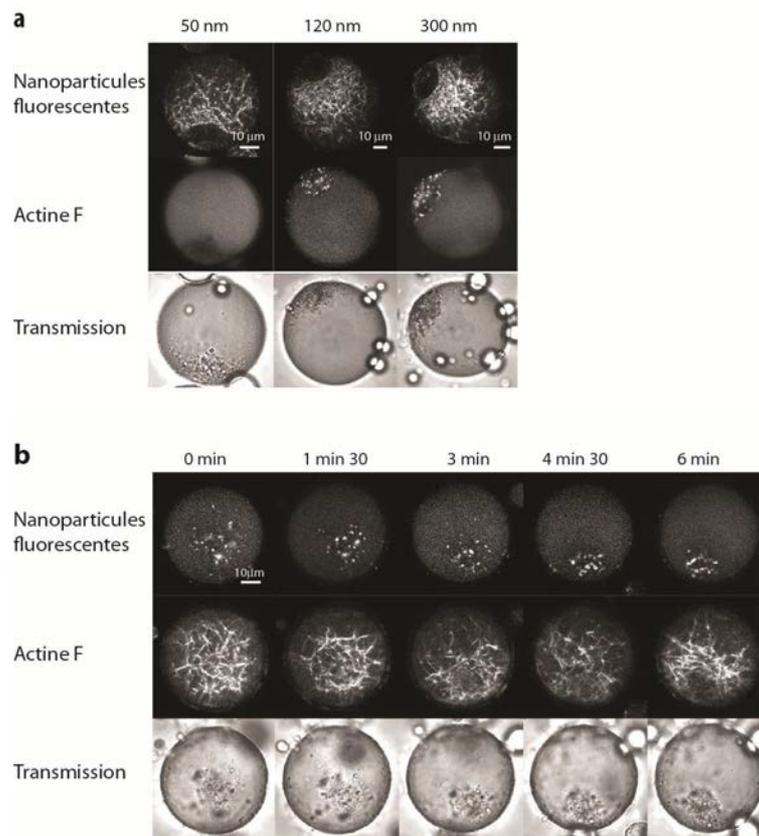


Figure 114 Transport d'objet par le flux d'actine. a, Transport de nanoparticules fluorescentes de 50 nm de diamètre (qui ne sont pas transportées), 120nm de diamètre et 300 nm de diamètre. b, Dynamique du transport de nanoparticules de 120 nm de diamètre.

2.3. Perturbation de la formation de l'anneau

La formation de l'anneau peut être perturbée en utilisant de la cytochalasine-D qui dépolymérise l'actine et de la blebbistatine qui inhibe l'action de la myosine-II. En l'absence de flux d'actine, nous n'avons pas observé d'accumulation d'éléments du cytoplasme ou de nanoparticules dans l'anneau d'actine (Figure 115).

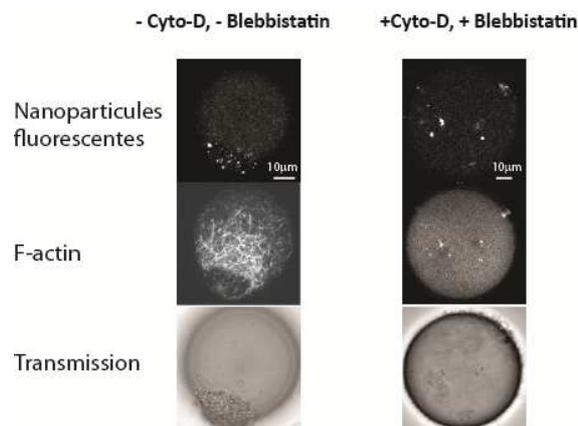


Figure 115 Le flux d'actine est perturbé par de la cytochalasine-D et de la blebbistatine.

3. Formation d'asters induite par RanQ69L

Notre objectif était de déclencher la nucléation des microtubules, grâce à l'augmentation de la concentration de RanQ69L induite par le confinement dans l'anneau d'actine. Pour cela nous avons travaillé dans des extraits cellulaires polymérisant l'actine et les microtubules (voir Méthodes). La première partie de ce projet, dont nous présentons ici les résultats préliminaires, consiste à étudier les liens entre l'actine F et les microtubules dans les extraits cellulaires de Xénope.

3.1. Assemblage des asters

Nous avons tout d'abord vérifié qu'il était possible de polymériser des microtubules avec les extraits permettant la polymérisation de l'actine. À 6 μM de RanQ69L des asters de microtubules se forment. De manière intéressante, ces asters semblent perturber localement le réseau d'actine (Figure 116). Les microfilaments d'actine s'alignent le long des microtubules. Ce résultat a été observé et étudié par Sider *et al.* et Waterman-Storer *et al.*^{163, 164}. Ils ont montré que ce sont bien les microtubules qui réorganisent l'actine, et que cette réorganisation intervient par le transport de l'actine, notamment par la dynéine.

Flux d'actine pour contrôler la nucléation des microtubules

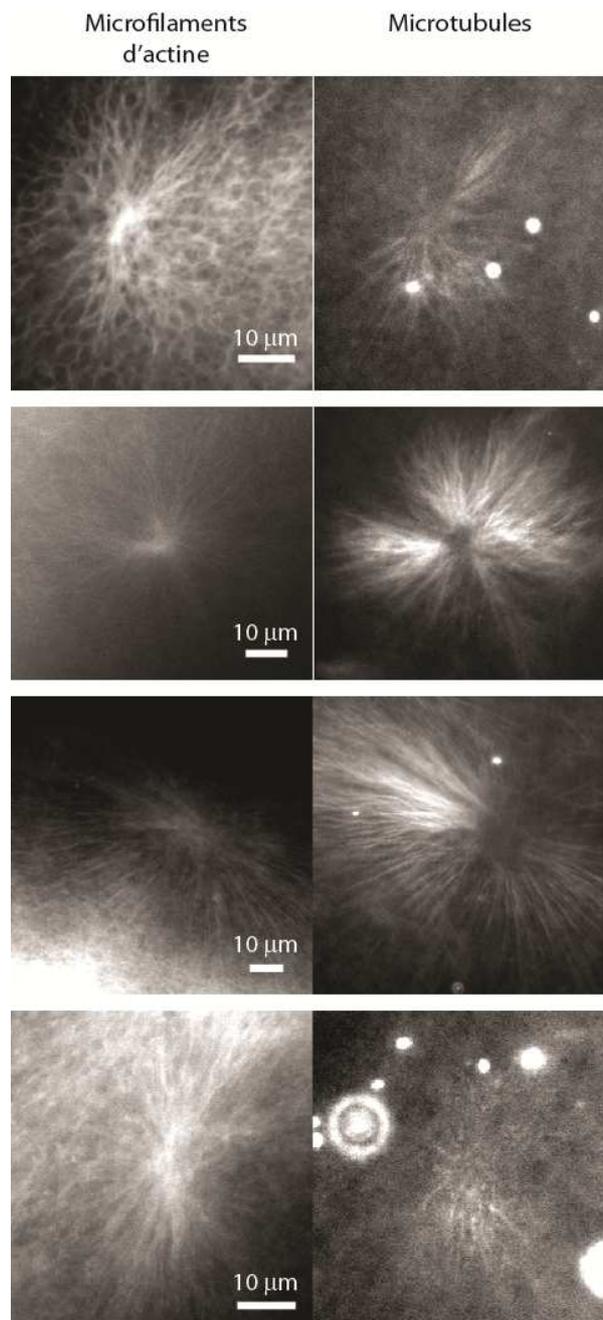


Figure 116 Réorganisation locale du réseau d'actine par les microtubules.

Nous avons ensuite testé la polymérisation en goutte de nos extraits cellulaires. À 6 µM de RanQ69L et après vingt minutes d'incubation, nous avons observé des asters de microtubules dans nos gouttes d'extraits cellulaires. Ces asters étaient systématiquement positionnés au centre de l'anneau (Figure 117).

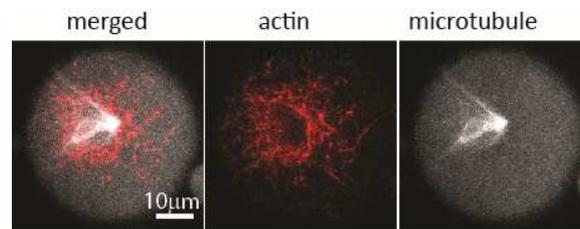


Figure 117 Aster de microtubules

La protéine RanQ69L induit la formation d'asters de microtubules dans les extraits cellulaires de Xénope avec un effet de seuil (Chap. 2 et 3).

3.2. Conservation des propriétés de signalisation de RanQ69L en extrait non encapsulé dans des gouttes

Nous avons quantifié la polymérisation des asters pour une concentration en RanQ69L variant de 0 à 8 μM , pour des extraits en volume. Après trente minutes d'incubation, nous avons observé les asters en microscopie de fluorescence grâce à de la tubuline fluorescente. Nous avons trouvé une dépendance sigmoïdale en concentration similaire à celle trouvée pour les extraits polymérisant uniquement les microtubules utilisés habituellement (Figure 118, a). Nous avons trouvé le même comportement après perturbation de l'actine avec de la cytochalasine-D et de la blebbistatine (Figure 118, b).

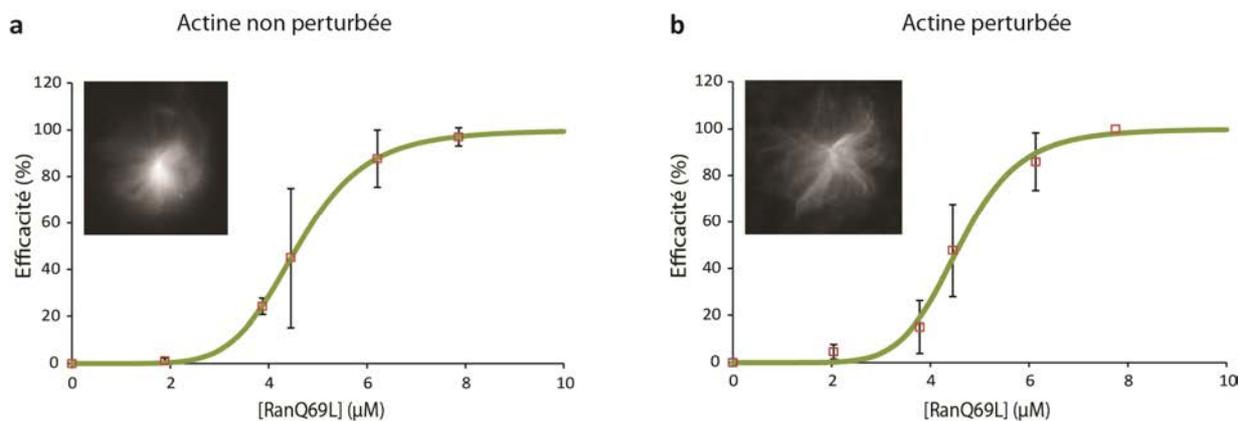


Figure 118 Seuil de polymérisation des microtubules. a, Sans perturbation du réseau d'actine. b, Avec perturbation du réseau d'actine. c, En goutte d'extrait cellulaire.

RanQ69L conserve donc ses propriétés de signalisation dans des extraits non encapsulés dans des gouttes.

4. Nucléation des microtubules induite par la contraction de l'actine

Nous avons donc un système nous permettant d'étudier le confinement de RanQ69L : nous avons des extraits cellulaires dans lesquels le comportement de seuil de RanQ69L vis-à-vis de la nucléation des asters est conservé, et qui nous permettent en perturbant l'actine d'avoir deux états, confiné et non confiné.

Nous avons couplé RanQ69L aux nanoparticules comme décrit précédemment (Méthodes et Chap. 3). Le complexe nanoparticules-RanQ69L (NP-Ran) a ensuite été introduit dans les extraits à une concentration inférieure au seuil de nucléation ($\sim 1\mu\text{M}$). Les extraits ont été encapsulés dans des gouttes (voir Méthodes). Après trente minutes d'incubation à 18°C , nous avons quantifié le nombre d'asters dans les gouttes. Nous avons suivi le même protocole en inhibant le flux d'actine avec de la cytochalasine-D et de la blebbistatine (Figure 119).

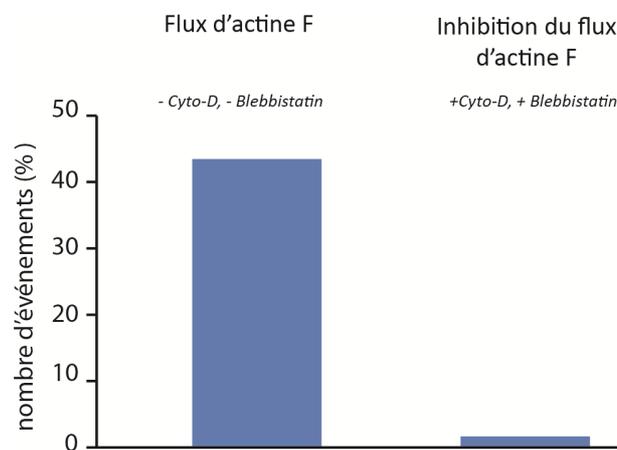


Figure 119 Formation d'aster induite par le confinement des NP-RanQ69L. Sans flux d'actine F, les nanoparticules couplées à RanQ69L sont dispersées dans la goutte, la concentration en RanQ69L est inférieure au seuil de nucléation et les asters ne se forment pas. En présence d'un flux d'actine F, les nanoparticules sont rassemblées dans l'anneau, ce qui provoque une augmentation locale de la concentration de RanQ69L et donc la formation d'asters. N1 = 8 expériences indépendantes, N2 = 458 sans flux d'actine, N3 = 391 gouttes en présence d'un flux d'actine.

Nous avons ensuite vérifié que le flux d'actine en lui-même ne pouvait pas induire la polymérisation des microtubules. De manière surprenante, après un temps d'incubation à 18°C (compris entre vingt et quarante minutes suivant les extraits), nous avons observé sans RanQ69L une polymérisation spontanée de microtubules (Figure 120).

Flux d'actine pour contrôler la nucléation des microtubules

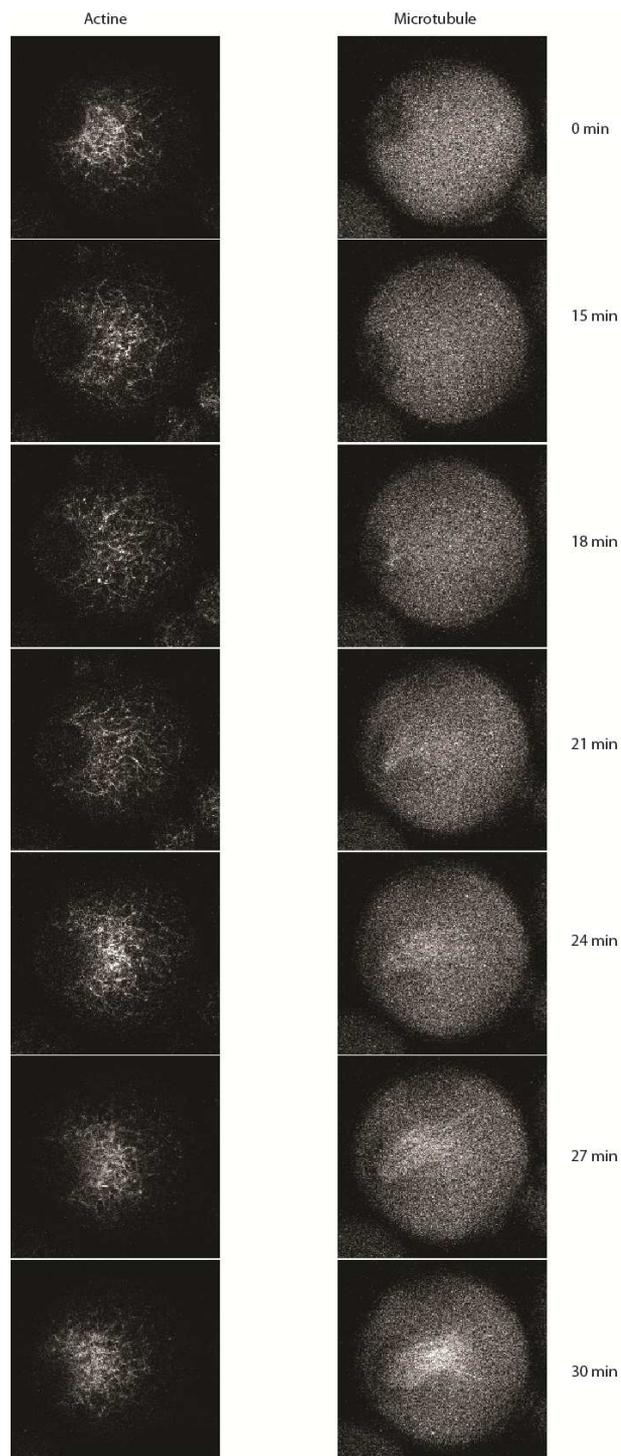


Figure 120 Polymérisation spontanée d'un aster dans un extrait encapsulé dans une goutte

Les microtubules ne semblent pas organisés en aster. Nous avons observé leur polarité grâce à EB1-GFP, un marqueur de polarité qui se déplace sur les microtubules de l'extrémité « - » à l'extrémité « + ». Les microtubules polymérisés spontanément sont polarisés, l'extrémité « + »

Flux d'actine pour contrôler la nucléation des microtubules

est globalement dirigée vers l'extérieur de l'anneau. En l'absence de confinement, c'est-à-dire après avoir perturbé l'actine avec de la cytochalasine-D et de la blebbistatine, nous n'avons plus observé cette nucléation spontanée.

Ce phénomène de contraction du réseau d'actine ne pourra pas nous permettre d'étudier le confinement de protéines que si nous travaillons avec un système biochimiquement orthogonal à l'actine. En effet, les microtubules, qui sont notre rapporteur de l'activation de RanQ69L, sont nucléés spontanément en présence d'un flux d'actine.

Cependant nous avons observé un nouveau mécanisme dans lequel une contraction de l'actine entraîne une polymérisation spontanée des microtubules, pour lequel nous n'avons pas d'explication à ce jour.

Bibliographie

1. Rodriguez-Boulan, E.; Macara, I. G., Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, 15, 225-242.
2. Etienne-Manneville, S., Cdc42 - the centre of polarity. *Journal of Cell Science* 2004, 117, 1291-1300.
3. Metzler, D., Biochemistry : the chemical reaction of living cells. Harcourt/Academic press: 2001.
4. Arnal, I.; Karsenti, E.; Hyman, A. A., Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts. *Journal of Cell Biology* 2000, 149, 767-774.
5. Howard, J., *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates: 2001.
6. Dimitrov, A.; Quesnoit, M.; Moutel, S.; Cantaloube, I.; Pous, C.; Perez, F., Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues. *Science* 2008, 322, 1353-1356.
7. Gittes, F.; Mickey, B.; Nettleton, J.; Howard, J., FLEXURAL RIGIDITY OF MICROTUBULES AND ACTIN-FILAMENTS MEASURED FROM THERMAL FLUCTUATIONS IN SHAPE. *Journal of Cell Biology* 1993, 120, 923-934.
8. Alberts, B.; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K., *Molecular biology of the cell. 4th Edition*. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf, January 2002: 2002.
9. Verde, F.; Berrez, J. M.; Antony, C.; Karsenti, E., TAXOL-INDUCED MICROTUBULE ASTERS IN MITOTIC EXTRACTS OF XENOPUS EGGS - REQUIREMENT FOR PHOSPHORYLATED FACTORS AND CYTOPLASMIC DYNEIN. *Journal of Cell Biology* 1991, 112, 1177-1187.
10. Mahoney, N. M.; Goshima, G.; Douglass, A. D.; Vale, R. D., Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Current Biology* 2006, 16, 564-569.
11. Dogterom, M.; Yurke, B., Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 1997, 278, 856-860.
12. Dogterom, M.; Kerssemakers, J. W.; Romet-Lemonne, G.; Janson, M. E., Force generation by dynamic microtubules. *Current Opinion in Cell Biology* 2005, 17, 67-74.
13. Fygenson, D. K.; Marko, J. F.; Libchaber, A., Mechanics of microtubule-based membrane extension. *Physical Review Letters* 1997, 79, 4497-4500.

14. Peskin, C. S.; Odell, G. M.; Oster, G. F., CELLULAR MOTIONS AND THERMAL FLUCTUATIONS - THE BROWNIAN RATCHET. *Biophysical Journal* 1993, 65, 316-324.
15. Mogilner, A.; Oster, G., The polymerization ratchet model explains the force-velocity relation for growing microtubules. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 1999, 28, 235-242.
16. Kerssemakers, J. W. J.; Janson, M. E.; van der Horst, A.; Dogterom, M., Optical trap setup for measuring microtubule pushing forces. *Applied Physics Letters* 2003, 83, 4441-4443.
17. Gardner, M. K.; Hunt, A. J.; Goodson, H. V.; Odde, D. J., Microtubule assembly dynamics: new insights at the nanoscale. *Current Opinion in Cell Biology* 2008, 20, 64-70.
18. Inoue, S., Mitotic organization and force generation by assembly/disassembly of microtubules. *Cell Structure and Function* 1996, 21, 375-379.
19. Grishchuk, E. L.; Molodtsov, M. I.; Ataulakhanov, F. I.; McIntosh, J. R., Force production by disassembling microtubules. *Nature* 2005, 438, 384-388.
20. Laan, L.; Pavin, N.; Husson, J.; Romet-Lemonne, G.; van Duijn, M.; Lopez, M. P.; Vale, R. D.; Juelicher, F.; Reck-Peterson, S. L.; Dogterom, M., Cortical Dynein Controls Microtubule Dynamics to Generate Pulling Forces that Position Microtubule Asters. *Cell* 2012, 148, 502-514.
21. Roberts, A. J.; Kon, T.; Knight, P. J.; Sutoh, K.; Burgess, S. A., Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013, 14, 713-726.
22. Svoboda, K.; Block, S. M., FORCE AND VELOCITY MEASURED FOR SINGLE KINESIN MOLECULES. *Cell* 1994, 77, 773-784.
23. Gennerich, A.; Carter, A. P.; Reck-Peterson, S. L.; Vale, R. D., Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein. *Cell* 2007, 131, 952-965.
24. Mallik, R.; Carter, B. C.; Lex, S. A.; King, S. J.; Gross, S. P., Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* 2004, 427, 649-652.
25. Albertson, D. G., FORMATION OF THE 1ST CLEAVAGE SPINDLE IN NEMATODE EMBRYOS. *Developmental Biology* 1984, 101, 61-72.
26. Strome, S., DETERMINATION OF CLEAVAGE PLANES. *Cell* 1993, 72, 3-6.
27. Kaltschmidt, J. A.; Davidson, C. M.; Brown, N. H.; Brand, A. H., Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nature Cell Biology* 2000, 2, 7-12.
28. Grill, S. W.; Hyman, A. A., Spindle positioning by cortical pulling forces. *Developmental Cell* 2005, 8, 461-465.

29. Kimura, K.; Kimura, A., Intracellular organelles mediate cytoplasmic pulling force for centrosome centration in the *Caenorhabditis elegans* early embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108, 137-142.
30. Mitchison, T.; Wuhr, M.; Nguyen, P.; Ishihara, K.; Groen, A.; Field, C. M., Growth, interaction, and positioning of microtubule asters in extremely large vertebrate embryo cells. *Cytoskeleton* 2012, 69, 738-750.
31. Burakov, A.; Nadezhdina, E.; Slepchenko, B.; Rodionov, V., Centrosome positioning in interphase cells. *Journal of Cell Biology* 2003, 162, 963-969.
32. Grill, S. W.; Howard, J.; Schaffer, E.; Stelzer, E. H. K.; Hyman, A., The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 2003, 301, 518-521.
33. Pinot, M.; Chesnel, F.; Kubiak, J. Z.; Arnal, I.; Nedelec, F. J.; Gueroui, Z., Effects of Confinement on the Self-Organization of Microtubules and Motors. *Current Biology* 2009, 19.
34. Dogterom, M.; Pargellis, A. N.; Yurke, B., Centering of microtubule asters by polymerization forces in micro-fabricated glass wells. *Biophysical Journal* 1996, 70, MAMC8-MAMC8.
35. Pavin, N.; Laan, L.; Ma, R.; Dogterom, M.; Juelicher, F., Positioning of microtubule organizing centers by cortical pushing and pulling forces. *New Journal of Physics* 2012, 14.
36. Wadhams, G. H.; Armitage, J. P., Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004, 5, 1024-1037.
37. Chung, C. Y.; Funamoto, S.; Firtel, R. A., Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends in Biochemical Sciences* 2001, 26, 557-566.
38. Goldstein, B., Embryonic polarity: A role for microtubules. *Current Biology* 2000, 10, R820-R822.
39. Wodarz, A., Establishing cell polarity in development. *Nature Cell Biology* 2002, 4, E39-E44.
40. Munro, E.; Nance, J.; Priess, J. R., Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C-elegans* embryo. *Developmental Cell* 2004, 7, 413-424.
41. Li, R.; Gundersen, G. G., Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, 9, 860-873.
42. Sohrmann, M.; Peter, M., Polarizing without a C(1)ue. *Trends in Cell Biology* 2003, 13, 526-533.
43. van der Gucht, J.; Sykes, C., Physical Model of Cellular Symmetry Breaking. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009, 1.

44. Soh, S.; Byrska, M.; Kandere-Grzybowska, K.; Grzybowski, B. A., Reaction-Diffusion Systems in Intracellular Molecular Transport and Control. *Angewandte Chemie-International Edition* 2010, 49.
45. Kholodenko, B. N., Cell-signalling dynamics in time and space. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006, 7, 165-176.
46. Brown, G. C.; Kholodenko, B. N., Spatial gradients of cellular phosphoproteins. *Febs Letters* 1999, 457, 452-454.
47. Kholodenko, B. N.; Hancock, J. F.; Kolch, W., Signalling ballet in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010, 11.
48. Kholodenko, B. N., Spatially distributed cell signalling. *Febs Letters* 2009, 583, 4006-4012.
49. Pearson, G.; Robinson, F.; Gibson, T. B.; Xu, B. E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M. H., Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 2001, 22, 153-183.
50. Fuller, B. G.; Lampson, M. A.; Foley, E. A.; Rosasco-Nitcher, S.; Le, K. V.; Tobelmann, P.; Brautigan, D. L.; Stukenberg, P. T.; Kapoor, T. M., Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* 2008, 453, 1132-U14.
51. Takai, Y.; Sasaki, T.; Matozaki, T., Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews* 2001, 81, 153-208.
52. Carazo-Salas, R. E.; Guarguaglini, G.; Gruss, O. J.; Segref, A.; Karsenti, E.; Mattaj, I. W., Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 1999, 400, 178-181.
53. Karsenti, E.; Vernos, I., Cell cycle - The mitotic spindle: A self-made machine. *Science* 2001, 294, 543-547.
54. Karsenti, E.; Newport, J.; Kirschner, M., RESPECTIVE ROLES OF CENTROSOMES AND CHROMATIN IN THE CONVERSION OF MICROTUBULE ARRAYS FROM INTERPHASE TO METAPHASE. *Journal of Cell Biology* 1984, 99, S47-S54.
55. Khodjakov, A.; Cole, R. W.; Oakley, B. R.; Rieder, C. L., Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current Biology* 2000, 10, 59-67.
56. Heald, R.; Tournebise, R.; Blank, T.; Sandaltzopoulos, R.; Becker, P.; Hyman, A.; Karsenti, E., Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 1996, 382, 420-425.
57. Caudron, M., Thèse de doctorat : coordination de l'assemblage du fuseau mitotique par des gradients d'interaction moléculaires générés par les chromosomes. Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2005.

58. Kalab, P.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Heald, R.; Weis, K., Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* 2006, 440, 697-701.
59. Nachury, M. V.; Maresca, T. J.; Salmon, W. G.; Waterman-Storer, C. M.; Heald, R.; Weis, K., Importin beta is a mitotic target of the small GTPase ran in spindle assembly. *Cell* 2001, 104, 95-106.
60. Gruss, O. J.; Carazo-Salas, R. E.; Schatz, C. A.; Guarguaglini, G.; Kast, J.; Wilm, M.; Le Bot, N.; Vernos, I.; Karsenti, E.; Mattaj, I. W., Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 2001, 104, 83-93.
61. Gruss, O. J.; Wittmann, M.; Yokoyama, H.; Pepperkok, R.; Kufer, T.; Sillje, H.; Karsenti, E.; Mattaj, I. W.; Vernos, I., Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nature Cell Biology* 2002, 4, 871-879.
62. Yokoyama, H.; Gruss, O. J.; Rybina, S.; Caudron, M.; Schelder, M.; Wilm, M.; Mattaj, I. W.; Karsenti, E., Cdk11 is a RanGTP-dependent microtubule stabilization factor that regulates spindle assembly rate. *Journal of Cell Biology* 2008, 180.
63. Caudron, M.; Bunt, G.; Bastiaens, P.; Karsenti, E., Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* 2005, 309.
64. Kalab, P.; Heald, R., The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *Journal of Cell Science* 2008, 121.
65. Nedelec, F.; Surrey, T.; Karsenti, E., Self-organisation and forces in the microtubule cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 2003, 15, 118-124.
66. Halpin, D.; Kalab, P.; Wang, J.; Weis, K.; Heald, R., Mitotic Spindle Assembly around RCC1-Coated Beads in Xenopus Egg Extracts. *Plos Biology* 2011, 9.
67. Barr, F. A.; Gruneberg, U., Cytokinesis: Placing and making the final cut. *Cell* 2007, 131, 847-860.
68. Mori, M.; Monnier, N.; Daigle, N.; Ellenberg, J.; Bathe, M.; Lenart, P., Chromosome transport by a homogeneously contracting F-actin meshwork in starfish oocytes. *Molecular Biology of the Cell* 2011, 22.
69. Mori, M.; Monnier, N.; Daigle, N.; Bathe, M.; Ellenberg, J.; Lenart, P., Intracellular Transport by an Anchored Homogeneously Contracting F-Actin Meshwork. *Current Biology* 2011, 21, 606-611.
70. Diesinger, P. M.; Mori, N. M. M.; Lenart, P.; Bathe, M., F-Actin Mediated Chromosome Transport. *Biophysical Journal* 2012, 102, 238A-238A.
71. Koenig, J. A.; Edwardson, J. M., Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 1997, 18, 276-287.

72. Miaczynska, M.; Pelkmans, L.; Zerial, M., Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* 2004, 16, 400-406.
73. Hwang, Y.; Kumar, P.; Barakat, A. I., Intracellular regulation of cell signaling cascades: how location makes a difference. *Journal of Mathematical Biology* 2014, 69, 213-242.
74. Burke, P.; Schooler, K.; Wiley, H. S., Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 2001, 12, 1897-1910.
75. Howe, C. L.; Mobley, W. C., Signaling endosome hypothesis: A cellular mechanism for long distance communication. *Journal of Neurobiology* 2004, 58, 207-216.
76. Kholodenko, B. N., MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *Trends in Cell Biology* 2002, 12, 173-177.
77. Kholodenko, B. N., Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: the roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. *Journal of Experimental Biology* 2003, 206, 2073-2082.
78. Sadowski, L.; Pilecka, I.; Miaczynska, M., Signaling from endosomes: Location makes a difference. *Experimental Cell Research* 2009, 315, 1601-1609.
79. Delcroix, J. D.; Valletta, J. S.; Wu, C. B.; Hunt, S. J.; Kowal, A. S.; Mobley, W. C., NGF signaling in sensory neurons: Evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 2003, 39, 69-84.
80. Wang, Y. N.; Yamaguchi, H.; Hsu, J. M.; Hung, M. C., Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 2010, 29, 3997-4006.
81. Taub, N.; Teis, D.; Ebner, H. L.; Hess, M. W.; Huber, L. A., Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signalling. *Molecular Biology of the Cell* 2007, 18, 4698-4710.
82. Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M., FRET imaging. *Nature Biotechnology* 2003, 21, 1387-1395.
83. Sekar, R. B.; Periasamy, A., Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *Journal of Cell Biology* 2003, 160, 629-633.
84. Weibel, D. B.; Whitesides, G. M., Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, 10, 584-591.
85. Lin, B.; Holmes, W. R.; Wang, C. J.; Ueno, T.; Harwell, A.; Edelstein-Keshet, L.; Inoue, T.; Levchenko, A., Synthetic spatially graded Rac activation drives cell

polarization and movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109, E3668-77.

86. Gautier, A.; Gauron, C.; Volovitch, M.; Bensimon, D.; Jullien, L.; Vriza, S., How to control proteins with light in living systems. *Nature Chemical Biology* 2014, 10, 533-541.

87. Levskaya, A.; Weiner, O. D.; Lim, W. A.; Voigt, C. A., Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* 2009, 461, 997-1001.

88. Lee, N.; Hyeon, T., Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews* 2012, 41, 2575-2589.

89. Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics* 2003, 36, R167-R181.

90. Molday, R. S.; Mackenzie, D., IMMUNOSPECIFIC FERROMAGNETIC IRON-DEXTRAN REAGENTS FOR THE LABELING AND MAGNETIC SEPARATION OF CELLS. *Journal of Immunological Methods* 1982, 52, 353-367.

91. Kularatne, B. Y.; Lorigan, P.; Browne, S.; Suvarna, S. K.; Smith, N. O.; Lawry, J., Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. *Cytometry* 2002, 50, 160-167.

92. Mura, C. V.; Becker, M. L.; Orellana, A.; Wolff, D., Immunopurification of Golgi vesicles by magnetic sorting. *Journal of Immunological Methods* 2002, 260, 263-271.

93. Widder, K. J.; Morris, R. M.; Poore, G. A.; Howard, D. P.; Senyei, A. E., SELECTIVE TARGETING OF MAGNETIC ALBUMIN MICROSPHERES CONTAINING LOW-DOSE DOXORUBICIN - TOTAL REMISSION IN YOSHIDA SARCOMA-BEARING RATS. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 1983, 19, 135-139.

94. Goodwin, S. C.; Bittner, C. A.; Peterson, C. L.; Wong, G., Single-dose toxicity study of hepatic intra-arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier. *Toxicological Sciences* 2001, 60, 177-183.

95. Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R. J.; Parak, F. G.; Hulin, P.; Bergemann, C.; Erhardt, W.; Wagenpfeil, S.; Lubbe, A. S., Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Research* 2000, 60, 6641-6648.

96. Del Pino, P., Tailoring the interplay between electromagnetic fields and nanomaterials toward applications in life sciences: a review. *Journal of biomedical optics* 2014, 19, 101507-101507.

97. Di Corato, R.; Espinosa, A.; Lartigue, L.; Tharaud, M.; Chat, S.; Pellegrino, T.; Menager, C.; Gazeau, F.; Wilhelm, C., Magnetic hyperthermia efficiency in the

cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials* 2014, 35, 6400-6411.

98. Mueller, S., Magnetic fluid hyperthermia therapy for malignant brain tumors-an ethical discussion. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 2009, 5, 387-393.

99. Gosse, C.; Croquette, V., Magnetic tweezers: Micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical Journal* 2002, 82, 3314-3329.

100. Crick, F. H. C.; Hughes, A. F. W., THE PHYSICAL PROPERTIES OF CYTOPLASM - A STUDY BY MEANS OF THE MAGNETIC PARTICLE METHOD .1. EXPERIMENTAL. *Experimental Cell Research* 1950, 1, 37-80.

101. Bausch, A. R.; Ziemann, F.; Boulbitch, A. A.; Jacobson, K.; Sackmann, E., Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal* 1998, 75, 2038-2049.

102. Tanase, M.; Biais, N.; Sheetz, M., Magnetic tweezers in cell biology. *Cell Mechanics* 2007, 83, 473-493.

103. de Vries, A. H. B.; Krenn, B. E.; van Driel, R.; Kanger, J. S., Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophysical Journal* 2005, 88, 2137-2144.

104. Wilhelm, C.; Gazeau, F.; Bacri, J. C., Rotational magnetic endosome microrheology: Viscoelastic architecture inside living cells. *Physical Review E* 2003, 67.

105. Wilhelm, C., Out-of-equilibrium microrheology inside living cells. *Physical Review Letters* 2008, 101.

106. Robert, D.; Aubertin, K.; Bacri, J. C.; Wilhelm, C., Magnetic nanomanipulations inside living cells compared with passive tracking of nanoprobe to get consensus for intracellular mechanics. *Physical Review E* 2012, 85.

107. Chevy, L.; Colin, R.; Abou, B.; Berret, J.-F., Intracellular micro-rheology probed by micron-sized wires. *Biomaterials* 2013, 34, 6299-6305.

108. Ino, K.; Ito, A.; Honda, H., Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnology and Bioengineering* 2007, 97, 1309-1317.

109. Fayol, D.; Le Visage, C.; Ino, J.; Gazeau, F.; Letourneur, D.; Wilhelm, C., Design of Biomimetic Vascular Grafts With Magnetic Endothelial Patterning. *Cell Transplantation* 2013, 22, 2105-2118.

110. Fayol, D.; Frasca, G.; Le Visage, C.; Gazeau, F.; Luciani, N.; Wilhelm, C., Use of Magnetic Forces to Promote Stem Cell Aggregation During Differentiation, and Cartilage Tissue Modeling. *Advanced Materials* 2013, 25, 2611-2616.

111. Dobson, J., Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 2008, 3, 139-143.
112. Hughes, S.; McBain, S.; Dobson, J.; El Haj, A. J., Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles. *Journal of the Royal Society Interface* 2008, 5, 855-863.
113. Kahn, C. R.; Baird, K. L.; Jarrett, D. B.; Flier, J. S., DIRECT DEMONSTRATION THAT RECEPTOR CROSSLINKING OR AGGREGATION IS IMPORTANT IN INSULIN ACTION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978, 75, 4209-4213.
114. Mahalingam, D.; Szegezdi, E.; Keane, M.; de Jong, S.; Samali, A., TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treatment Reviews* 2009, 35, 280-288.
115. Mannix, R. J.; Kumar, S.; Cassiola, F.; Montoya-Zavala, M.; Feinstein, E.; Prentiss, M.; Ingber, D. E., Nanomagnetic actuation of receptor-mediated signal transduction. *Nature Nanotechnology* 2008, 3.
116. Lee, J.-H.; Kim, E. S.; Cho, M. H.; Son, M.; Yeon, S.-I.; Shin, J.-S.; Cheon, J., Artificial Control of Cell Signaling and Growth by Magnetic Nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition* 2010, 49.
117. Bharde, A. A.; Palankar, R.; Fritsch, C.; Klaver, A.; Kanger, J. S.; Jovin, T. M.; Arndt-Jovin, D. J., Magnetic Nanoparticles as Mediators of Ligand-Free Activation of EGFR Signaling. *Plos One* 2013, 8.
118. Huang, H., et al., Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 2010, 5, 602-606.
119. Stanley, S. A.; Gagner, J. E.; Damanpour, S.; Yoshida, M.; Dordick, J. S.; Friedman, J. M., Radio-Wave Heating of Iron Oxide Nanoparticles Can Regulate Plasma Glucose in Mice. *Science* 2012, 336, 604-608.
120. Yamaguchi, M.; Ito, A.; Ono, A.; Kawabe, Y.; Kamihira, M., Heat-Inducible Gene Expression System by Applying Alternating Magnetic Field to Magnetic Nanoparticles. *Acs Synthetic Biology* 2014, 3, 273-279.
121. Etoc, F.; Lisse, D.; Bellaiche, Y.; Piehler, J.; Coppey, M.; Dahan, M., Subcellular control of Rac-GTPase signalling by magnetogenetic manipulation inside living cells. *Nat Nano* 2013, 8, 193-198.
122. Hoffmann, C.; Mazari, E.; Lallet, S.; Le Borgne, R.; Marchi, V.; Gosse, C.; Gueroui, Z., Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles. *Nat Nano* 2013, 8, 199-205.
123. Steketee, M. B.; Moysidis, S. N.; Jin, X.-L.; Weinstein, J. E.; Pita-Thomas, W.; Raju, H. B.; Iqbal, S.; Goldberg, J. L., Nanoparticle-mediated signaling endosome

localization regulates growth cone motility and neurite growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108.

124. Hensey, C.; Gautier, J., A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mechanisms of Development* 1997, 69, 183-195.

125. Murray, A. W., CELL-CYCLE EXTRACTS. *Methods in Cell Biology* 1991, 36, 581-605.

126. Desai, A.; Murray, A.; Mitchison, T. J.; Walczak, C. E., The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function in vitro. *Methods in Cell Biology, Vol 61* 1999, 61, 385-412.

127. Hannak, E.; Heald, R., Investigating mitotic spindle assembly and function in vitro using *Xenopus laevis* egg extracts. *Nature Protocols* 2006, 1, 2305-2314.

128. Field, C. M.; Nguyen, P. A.; Ishihara, K.; Groen, A. C.; Mitchison, T. J., *Xenopus* Egg Cytoplasm with Intact Actin. *Reconstituting the Cytoskeleton* 2014, 540, 399-415.

129. Pinot, M.; Steiner, V.; Dehapiot, B.; Yoo, B.-K.; Chesnel, F.; Blanchoin, L.; Kervrann, C.; Gueroui, Z., Confinement induces actin flow in a meiotic cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109.

130. Okada, C. Y.; Rechsteiner, M., INTRODUCTION OF MACROMOLECULES INTO CULTURED MAMMALIAN-CELLS BY OSMOTIC LYSIS OF PINOCYTIC VESICLES. *Cell* 1982, 29, 33-41.

131. Wilhelm, C.; Gazeau, F., Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 2008, 29, 3161-3174.

132. Etoc, F., Thèse de doctorat : "Vers un contrôle de la magnétique polarité cellulaire". UPMC, Paris 6, 2013.

133. Bastiaens, P.; Caudron, M.; Niethammer, P.; Karsenti, E., Gradients in the self-organization of the mitotic spindle. *Trends in Cell Biology* 2006, 16, 125-134.

134. Niethammer, P.; Bastiaens, P.; Karsenti, E., Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells. *Science* 2004, 303, 1862-1866.

135. Kim, S.; Kim, H. J.; Jeon, N. L., Biological applications of microfluidic gradient devices. *Integrative Biology* 2010, 2, 584-603.

136. Bonnemay, L.; Hostachy, S.; Hoffmann, C.; Gautier, J.; Gueroui, Z., Engineering Spatial Gradients of Signaling Proteins Using Magnetic Nanoparticles. *Nano Letters* 2013, 13, 5147-5152.

137. Goubault, Thèse de doctorat : "Colloïdes magnétiques : auto-organisation et applications biologiques". UPMC-Paris 6, 2004.

138. Schaller, V.; Kraeling, U.; Rusu, C.; Petersson, K.; Wippenmyr, J.; Krozer, A.; Wahnstroem, G.; Sanz-Velasco, A.; Enoksson, P.; Johansson, C., Motion of

- nanometer sized magnetic particles in a magnetic field gradient. *Journal of Applied Physics* 2008, 104.
139. Erb, R. M.; Sebba, D. S.; Lazarides, A. A.; Yellen, B. B., Magnetic field induced concentration gradients in magnetic nanoparticle suspensions: Theory and experiment. *Journal of Applied Physics* 2008, 103.
140. Liu, J.; Lawrence, M.; Wu, A.; Ivey, M. L.; Flores, G. A.; Javier, K.; Bibette, J.; Richard, J., FIELD-INDUCED STRUCTURES IN FERROFLUID EMULSIONS. *Physical Review Letters* 1995, 74, 2828-2831.
141. Lipfert, J.; Hao, X. M.; Dekker, N. H., Quantitative Modeling and Optimization of Magnetic Tweezers. *Biophysical Journal* 2009, 96, 5040-5049.
142. Mazari, E., Thèse de doctorat "Microsystèmes magnétiques et électriques pour la modification spatio-temporelle de voies de signalisation biologiques".
143. Valentine, M. T.; Perlman, Z. E.; Mitchison, T. J.; Weitz, D. A., Mechanical properties of *Xenopus* egg cytoplasmic extracts. *Biophysical Journal* 2005, 88, 680-689.
144. Jimenez, A. M.; Roche, M.; Pinot, M.; Panizza, P.; Courbin, L.; Gueroui, Z., Towards high throughput production of artificial egg oocytes using microfluidics. *Lab on a Chip* 2011, 11, 429-434.
145. Athale, C. A.; Dinarina, A.; Mora-Coral, M.; Pugieux, C.; Nedelec, F.; Karsenti, E., Regulation of Microtubule Dynamics by Reaction Cascades Around Chromosomes. *Science* 2008, 322, 1243-1247.
146. Vignaud, T.; Blanchoin, L.; Thery, M., Directed cytoskeleton self-organization. *Trends in Cell Biology* 2012, 22, 671-682.
147. Kimura, A.; Onami, S., Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C-elegans* male pronuclear migration. *Developmental Cell* 2005, 8, 765-775.
148. McNally, F. J., Mechanisms of spindle positioning. *Journal of Cell Biology* 2013, 200, 131-140.
149. Kiyomitsu, T.; Cheeseman, I. M., Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nature Cell Biology* 2012, 14, 311-317.
150. Wang, Y.; Pennock, S.; Chen, X. M.; Wang, Z. X., Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Molecular and Cellular Biology* 2002, 22, 7279-7290.

151. Normanno, N.; De Luca, A.; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M. R.; Carotenuto, A.; De Feo, G.; Caponigro, F.; Salomon, D. S., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006, 366, 2-16.
152. Creixell, M.; Bohorquez, A. C.; Torres-Lugo, M.; Rinaldi, C., EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a Perceptible Temperature Rise. *Acs Nano* 2011, 5, 7124-7129.
153. Jorissen, R. N.; Walker, F.; Pouliot, N.; Garrett, T. P. J.; Ward, C. W.; Burgess, A. W., Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* 2003, 284, 31-53.
154. Sousa, L. P.; Lax, I.; Shen, H.; Ferguson, S. M.; De Camilli, P.; Schlessinger, J., Suppression of EGFR endocytosis by dynamin depletion reveals that EGFR signaling occurs primarily at the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109, 4419-4424.
155. Rizzolio, S.; Tamagnone, L., Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Endocytosis Assay in A549 Cells. *Bio-protocol* 3(15): e847. <http://www.bio-protocol.org/e847>: 2013.
156. Loubery, S.; Wilhelm, C.; Hurbain, I.; Neveu, S.; Louvard, D.; Coudrier, E., Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic* 2008, 9, 492-509.
157. Robert, D.; Nguyen, T. H.; Gallet, F.; Wilhelm, C., In Vivo Determination of Fluctuating Forces during Endosome Trafficking Using a Combination of Active and Passive Microrheology. *Plos One* 2010, 5.
158. Hosu, B. G.; Mullen, S. F.; Critser, J. K.; Forgacs, G., Reversible Disassembly of the Actin Cytoskeleton Improves the Survival Rate and Developmental Competence of Cryopreserved Mouse Oocytes. *Plos One* 2008, 3.
159. Tseng, P.; Judy, J. W.; Di Carlo, D., Magnetic nanoparticle-mediated massively parallel mechanical modulation of single-cell behavior. *Nature Methods* 2012, 9, 1113-1119.
160. Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J., Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* 1998, 23, 481-485.
161. Simons, K.; Toomre, D., Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000, 1, 31-39.
162. Goswami, D.; Gowrishankar, K.; Bilgrami, S.; Ghosh, S.; Raghupathy, R.; Chadda, R.; Vishwakarma, R.; Rao, M.; Mayor, S., Nanoclusters of GPI-Anchored Proteins Are Formed by Cortical Actin-Driven Activity. *Cell* 2008, 135, 1085-1097.
163. Waterman-Storer, C.; Duey, D. Y.; Weber, K. L.; Keech, J.; Cheney, R. E.; Salmon, E. D.; Bement, W. M., Microtubules remodel actomyosin networks in

Xenopus egg extracts via two mechanisms of F-actin transport. *Journal of Cell Biology* 2000, 150, 361-376.

164. Sider, J. R.; Mandato, C. A.; Weber, K. L.; Zandy, A. J.; Beach, D.; Finst, R. J.; Skoble, J.; Bement, W. M., Direct observation of microtubule-f-actin interaction in cell free lysates. *Journal of Cell Science* 1999, 112, 1947-1956.