



Contrôle Optogénétique de la Polarité Cellulaire

Léo Valon

► To cite this version:

Léo Valon. Contrôle Optogénétique de la Polarité Cellulaire. Physique [physics]. Ecole normale supérieure - ENS PARIS, 2014. Français. ⟨NNT : 2014ENSU0008⟩. ⟨tel-01303839⟩

HAL Id: tel-01303839

<https://theses.hal.science/tel-01303839v1>

Submitted on 18 Apr 2016

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.



HAL Authorization



Thèse de Doctorat

En vue de l'obtention du grade de



DOCTEUR

DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

École doctorale : Physique en Île de France

Discipline ou spécialité : Physique

Présentée et soutenue par :

Léo VALON

Sujet de la thèse :

Contrôle Optogénétique de la Polarité Cellulaire.

Unité de recherche : Institut Physico-Chimie Curie – UMR 168

Thèse dirigée par : Maxime DAHAN

Soutenue le 22 septembre 2014 devant un jury composé de :

Mme. Catherine VILLARD	Rapporteur
M. Olivier DESTAING	Rapporteur
M. Jean-François ALLEMAND	
M. Jacques CAMONIS	
M. Benoit LADOUX	
M. Maxime DAHAN	Directeur de thèse
M. Mathieu COPPEY	Membre invité

Numéro identifiant de la Thèse : 73523

Remerciements

Tant que cette dernière page n'est pas tournée, il m'est difficile de réaliser l'étendue des expériences apprises durant ma thèse. Cependant, j'en dégagerai ici une principale : l'importance du cadre de recherche. En cela, la diversité scientifique des membres de l'équipe, ainsi que la proximité des autres équipes de recherche de l'Institut Curie ont beaucoup enrichi le contenu de ma thèse. Ce sont donc à travers les quelques lignes de ce chapitre que je tiens à remercier ces personnes chaleureuses et ouvertes d'esprit, qui ont plaisir à parler de leur science et à comprendre celle des autres.

Dans le rôle du jury de thèse, Jean-François Allemand, Catherine Villard, Olivier Destaing, Jacques Camonis et Benoit Ladoux, pour les heures consacrées à lire ce manuscrit durant l'été.

Dans le rôle du directeur de thèse bienveillant : Maxime Dahan, qui m'a permis de m'épanouir au sein de son équipe de recherche et m'a toujours laissé libre de mes choix de recherche.

Dans le rôle de l'encadrant de thèse joyeux, motivé et positif : Mathieu Coppey, qui a toujours eu les accès de génie aux moments opportuns, que cela concerne les expériences ou la théorie. Mathieu, merci encore de ton encadrement, de ton écoute et de ta gentillesse.

Dans le rôle du révélateur de vocation : Guillaume Charras, chez qui j'ai effectué mon premier stage en biophysique à Londres et qui m'a donné envie de continuer à jouer avec des cellules pour en comprendre le fonctionnement. De plus, cette thèse n'aurait pas été aussi étoffée sans les nombreuses conversations que nous avons eues ensemble au cours de ces trois dernières années.

Dans le rôle des formateurs de culture biophysique : les responsables des premiers cours que j'ai suivis dans ce domaine. Soient, en M1 à l'ENS, Jean-François Joanny et Frédéric Chevy, et en M2, tous les encadrants et les professeurs du master « Interface Physique et Biologie », en particulier Mathilde Badoual, Julien Heuvingh, Michael Dubow et Philippe Vernier. Par ailleurs, je salue Jean-François Allemand avec qui il fut très agréable d'enseigner la biophysique dans le cadre de mon monitorat.

Dans le rôles des supers membres de l'équipe LOCCO, à qui j'ai envie de dire : Simon, Bien joué papa !, Amanda, Envole toi petit papillon !, Chiara, C'est pas l'heure du séminaire ?, Momo, Tu es mon idole !, Teresa, Viva la mama !, Davide, Bravo !, Laurent, Bonne route ! Merci aussi à Ignacio, Aurélien, Bassam, Lydia, Domenik. Je saluerai de plus les étudiants motivés de passage au labo : Laura, Marylou, Agathe, Joseph et Virginie. Sans oublier Fred, l'enfant de Django avec qui cette thèse a commencé.

Dans le rôle des Optoclubbeurs, avec qui nous avons travaillé depuis le début : Xavier Morin et Florencia Di Pietro, pour nos nombreux échanges en biologie et en physique.

Dans le rôle des tout premiers membres du French Opto-Club : Martial Balland et Olivier Destaing, avec qui discuter boulot et organiser des jeux lors de conférences est toujours un plaisir.

Dans le rôle des gentils relecteurs de chapitres (par ordre d'apparition) : François, Christine, Marion, Claire, Audrey, Arnaud, Sophie, Bastien, Laurent, Simon, Aurélien, Sandrine, Fanny, vous avez été là au bon moment.

Dans le rôle des directeurs d'équipe auprès de qui il est si simple de discuter de science, de demander des conseils, de parler de vacances : Pascal Silberzan, Emmanuel Farges, Axel Buguin, Julie Plastino, Ceciles Sykes, Daniel Levy et Patricia Bassereau.

Bien que moins reliés au contenu direct de cette thèse, ils font partie intégrante de cette entreprise. Pour leur aptitude à me supporter dans les deux sens du terme, je remercie :

Dans le rôle des gentils camarades de Curie, pour nous avoir chaleureusement accueillis entre leurs murs et sans qui travailler ici aurait été moins joyeux : Sandrine pour les midis animés, Fahima et Marine pour les allures de chefs, John et cet air d'Australie, Simon G. & Guillaume D. les inséparables du 2^{ème}, Hannah, Perrine, Démosthène, et tous les autres...

Dans le rôle des gentils camarades de l'IBENS : la team de girl du 3^{ème} étage, Lou, John.

Dans le rôle de la meilleur promo IPB ever : Maxime, Pauline, Hugo et les autres, tous amoureux de biophysique.

Dans le rôle de mes copains de tous les jours sans qui la vie parisienne aurait un autre goût : Sophitou, PY, Nono, Mikado, Clairette, Piotr, Anaïs, Audrey, Chatoune, Mussard, Niloute, Fannytou, Val, Domdom, Sandra, Corentin, Juliette, Maxou, Popo, et les inmanquablement oubliés pour tous les week-ends passés ensembles et bien plus encore.

Dans le rôle des trop loin des yeux mais proches du cœur : Môm', Jo, Gaï, Co, Orianne, et les autres Andréanais, Nazairiens et Nantais, délaissés à cause de Paris.

Enfin, je souhaiterais remercier les personnes qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

Dans le rôle de la petite amie merveilleuse : Marion, dont j'admire la capacité à comprendre tous ce que je fais et à toujours me poser des questions ô combien pertinentes.

Dans le rôle de la famille sans faille : Papa, Maman, Aurèle et Justine, qui m'ont toujours poussé à faire ce que j'aimais quitte à les délaisser un peu. Je saluerai de plus mes grands-parents Thérèse et Robert, pour leur gentillesse et les nombreux spectacles que nous sommes allés voir ensemble, nous sortant de la grisaille des jours d'hivers.

Table des matières

Chapitre 1 Introduction	11
1.1 POLARITE CELLULAIRE	12
1.1.1 Définition et exemples.....	12
1.1.2 Polarité et migration cellulaire.....	16
1.2 LES RHOGTPASES ET LA MIGRATION CELLULAIRE	20
1.2.1 Les RhoGTPases.....	20
1.2.2 Modules de RhoGTPases	23
1.2.3 Observation des RhoGTPases.....	25
1.2.4 Contrôle de la polarité cellulaire	28
1.3 CONTROLE OPTOGENETIQUE DE L'ACTIVITE CELLULAIRE.....	31
1.3.1 Contrôle optogénétique de l'activité de récepteurs membranaires.....	31
1.3.2 Contrôle de l'activité cellulaire par la lumière.....	33
Chapitre 2 Système optogénétique CRY2/CIBN	41
2.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL D'OPTOGENETIQUE.....	42
2.1.1 Système biologique	42
2.1.2 Dispositif de microscopie.....	43
2.2 DYNAMIQUE DE CRY2-MCHERRY A LA MEMBRANE	46
2.2.1 Recrutement global et diffusion cytoplasmique	46
2.2.2 Recrutement local, diffusion membranaire et dissociation	47
2.3 DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES BIOPHYSIQUES DE CRY2/CIBN	50
2.3.1 Recrutement de CRY2 à la membrane	50
2.3.2 Diffusion membranaire de CIBN et du complexe CRY2/CIBN	53
2.3.3 Dissociation du complexe CRY2/CIBN	55
2.4 DYNAMIQUE DU RECRUTEMENT ET ETAT STATIONNAIRE	57
2.4.1 Dynamique du recrutement	57
2.4.2 Etat stationnaire	59
2.5 CONTROLE QUANTITATIF DU NIVEAU DE L'ETAT STATIONNAIRE	65
2.5.1 Choix du niveau final	65
2.5.2 Diminution du temps de montée à l'état stationnaire	68
2.6 RESUME.....	71
Chapitre 3 Migration par les RhoGTPases.....	73
3.1 CONTROLE LOCAL DE L'ACTIVITE DE RHOGTPASES.....	74

3.1.1 Constructions moléculaires	74
3.1.2 Sondes fluorescentes des RhoGTPases	75
3.1.3 Activation subcellulaire de Rac1 et de Cdc42	76
3.1.4 Activation subcellulaire de RhoA	77
3.2 MODIFICATION LOCALE DES PROPRIETES DE LA CELLULE	79
3.2.1 Analyse d'image	79
3.2.2 Recrutement local de Tiam1	85
3.2.3 Recrutement local de Intersectin	87
3.2.4 Recrutement local de ArhGEF11	89
3.3 INTEGRATION GLOBALE DE LA PERTURBATION	91
3.3.1 Intersectin	91
3.3.2 ArhGEF11	93
3.4 INVERSION DE LA POLARITE	95
3.4.1 Doubles patrons arbalètes	95
3.4.2 Inversion de la polarité avec ITSN	96
3.5 MECANISMES D'INTEGRATION GLOBALE DE LA POLARITE	98
3.5.1 Régulation des RhoGTPases à longue portée	98
3.5.2 Tension de membrane	99
3.5.3 Flux de cytosol	100
3.6 RESUME	103
Chapitre 4 Dissection moléculaire de l'activation de RhoA	105
4.1 DYNAMIQUE DES POINTS FOCaux	106
4.1.1 Intersectin	106
4.1.2 ArhGEF11	107
4.2 INTERACTION ARH-ACTINE	110
4.2.1 Polymérisation d'actine	110
4.2.2 Conditions non saturantes de recrutement	112
4.2.3 Modèle d'interaction GEF actine	113
4.2.4 Détermination expérimentale de <i>k_{off}</i>	116
4.2.5 Interactions ArhGEF11/RBD	121
4.2.6 Modèle spatial	122
4.3 INTERACTIONS ACTO-MYOSINES	126
4.3.1 Observations	126
4.3.2 ArhGEF11-CRY2-Δ(mCherry)	128
4.3.3 Dynamique des myosines	131
4.3.4 Utilisation de drogues	132
4.4 RESUME	135
Chapitre 5 Discussion et perspectives	137
5.1 CONCLUSION	138
5.1.1 Transposition de la méthode	138
5.1.2 Plateforme pour l'étude de la polarité	139
5.1.3 Analyse intégrée de la réponse d'un réseau de signalisation	141
5.2 AMELIORATION DU CONTROLE DE L'ACTIVITE DES RHOGTPASES	143
5.2.1 Modification du système CRY2/CIBN	143

5.2.2 Amélioration de l'approche	144
5.3 PERSPECTIVES	148
5.3.1 In vitro	148
5.3.2 Cellule unique.....	149
5.3.3 Tissus reconstitués	150
5.3.4 In vivo	151

Chapitre 1 Introduction

Dans ce premier Chapitre nous aborderons, tout d'abord un élément clé de nombreux processus en biologie : la polarité. De la migration de cellules uniques au développement des organismes, de nombreux phénomènes sont regroupés sous cette dénomination. Après avoir abordé sa définition et certaines de ses propriétés aux différentes échelles spatiales et temporelles, nous nous focaliserons sur la description précise de la polarité cellulaire pendant la migration cellulaire. Depuis une vingtaine d'années, il a été décrit dans ce domaine l'importance majeure d'une famille de protéines : les RhoGTPases. Nous présenterons les développements successifs qui ont permis de comprendre leurs rôles et la dynamique de leur activité dans les cellules. Les dernières méthodes développées ayant encore certaines limites, nous discuterons de la mise en œuvre d'outils optogénétiques permettant un contrôle non invasif, direct, local et quantitatif de l'activité des protéines dans les cellules. Le but de cette approche étant de contrôler la polarité cellulaire avec de la lumière.

1.1 Polarité cellulaire

1.1.1 Définition et exemples

La notion de polarité en biophysique nous confronte à un problème de différence de définition entre la physique et la biologie. Un crayon papier (Figure 1-1) possède-t-il une polarité ? Ce type d'objet possède un axe principal et deux extrémités, une qui écrit et l'autre non. Mais cela suffit-il à le définir comme un objet polarisé ?



Figure 1-1 : Image d'un aimant droit et d'un crayon papier. Source : Google image. Taille caractéristique de ces objets : 10 à 20 cm.

Définitions de la polarité

En physique, un système physique est considéré comme polaire s'il est doté de pôles. Ces pôles doivent par ailleurs produire des effets physiques distincts en différents points du système et ces effets doivent être opposés entre eux. Les pôles du crayon n'ont pas des effets opposés, ils sont juste différents. Ainsi, selon cette définition, ce crayon n'est pas polarisé.

A contrario, un aimant est polarisé. Chacun de ses pôles exerce sur une particule chargée une force opposée. Par ailleurs, il existe en son sein une distribution ordonnée de structures qui permettent, à n'importe quel endroit de celui-ci, de tracer une flèche qui pointe vers la direction d'un pôle.

Il existe en biologie des exemples où cette idée de polarité semble résister à la définition physique. L'exemple le plus ancien vient des observations faites par George J. Allman en 1864 avec le modèle de l'hydre *Tubularia*. Cet organisme, qui possède un « pied » et une « tête » (Figure 1-2), a la propriété, lorsqu'il est coupé en deux, de se régénérer en deux copies identiques. Un unique segment de cet organisme peut lui-même recréer une tête dans la direction de la tête et un pied à la place du pied d'origine, cette polarité est donc locale.

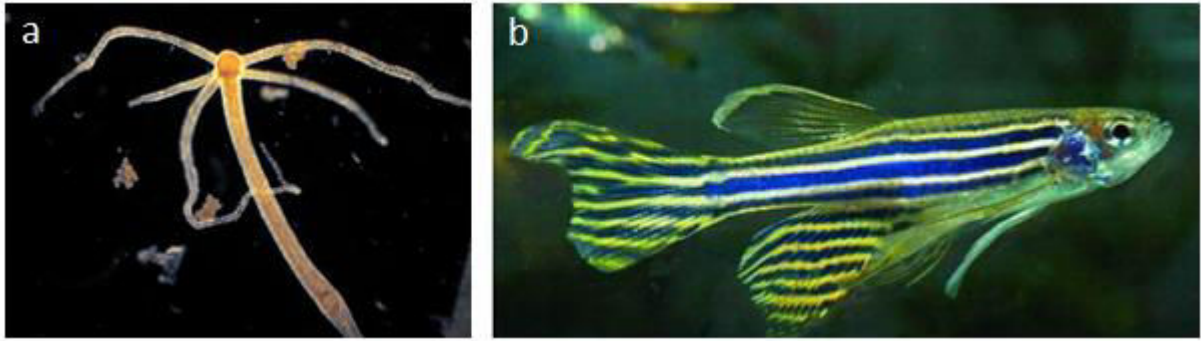


Figure 1-2 : Exemples d'organismes possédant une polarité en biologie. Image d'une hydre *Tubularia* (a) d'environ 3 mm de haut et d'un poisson Zebrafish (b) d'environ 3 cm. Source : Google image

Cependant, cette définition physique de la polarité possède certaines limites. Si nous découpons un aimant non parfaitement magnétisé en petits éléments, jusqu'à arriver à une dimension en dessous de la taille caractéristique des domaines de Weiss, nous allons être confrontés à certains domaines qui ne possèdent pas le même moment magnétique que l'aimant entier. A cette échelle, les propriétés locales ne sont donc pas identiques aux globales. La définition de la polarité est donc fonction de l'échelle considérée.

Nous allons utiliser dans cette thèse une définition un peu moins restrictive de la polarité qui est celle utilisée par les biologistes et les biophysiciens. Il s'agit de la tendance d'un organisme, ou d'une partie d'un organisme à se développer, croître ou s'orienter selon un axe distinct. Comme nous allons le voir, cette polarité dépend beaucoup de l'échelle spatiale et temporelle considérée pour un système donné (1).

Exemples de polarité en biologie

Comment expliquer par exemple que l'on parle de polarité antéro-postérieure du poisson zèbre *Danio Rerio* alors que la tête et la queue d'un poisson (Figure 1-2) ne sont pas de la même nature et ne possèdent pas la même fonction ? Dans le cas des embryons du poisson zèbre comme dans le cas de celui de la mouche *Drosophila Melanogaster*, c'est la présence, durant les premières phases de développement, d'états biologiquement très polarisés qui explique cette dénomination. Comme sur l'exemple de la protéine Bicoïd chez la drosophile (Figure 1-3, a), les embryons peuvent avoir une organisation moléculaire asymétrique.

Cette organisation asymétrique de protéines entraîne une expression génétique des cellules différente selon le niveau et le gradient de molécules ressentis ce qui oriente leur devenir ultérieur (2). L'organisation spatiale de l'activité des cellules étant indispensable à la création de toutes les structures futures de cet animal durant le développement embryonnaire (Figure 1-3, b).

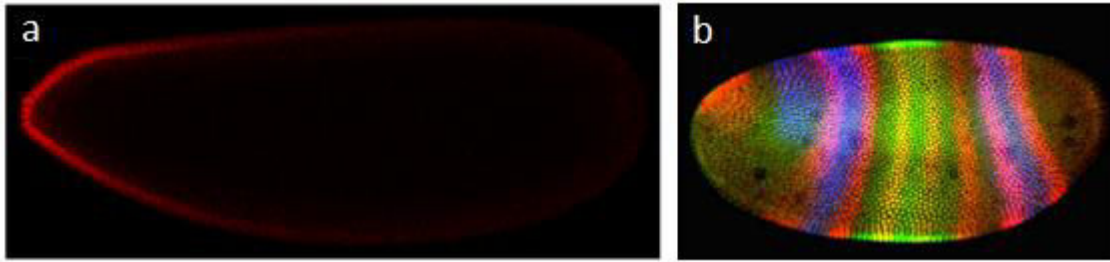


Figure 1-3 : Développement et polarité antéro-postérieure. (a) Signal de fluorescence de la protéine Bicoïd dans l'embryon de *Drosophile* (adapté de (2)). (b) Image de fluorescence des protéines Hairy en rouge, Kruppel en vert et Giant en bleue dans un embryon de *Drosophile* (Image récupérée de la collection de Stephen Paddock hébergée par le site internet de Nikon). Longueur caractéristique des embryons : 500 μm .

Ces phénomènes de polarité ne sont pas uniquement importants à l'échelle de l'organisme, ils sont présents également à l'échelle du tissu et du groupe de cellules comme présenté sur les deux exemples suivants (3). Une monocouche de cellules de *drosophile* génère, par exemple, à partir d'une répartition asymétrique d'une protéine (Figure 1-4, c, d), une réorganisation des cellules voisines et modifie de proche en proche la totalité d'un tissu (Figure 1-4, a, b). Dans cet exemple particulier, les myosines II, polarisées selon un seul axe de l'embryon, augmentent la contractilité selon cet axe ce qui entraîne la contraction globale du tissu (4). Ces processus sont très importants pendant le développement, que ce soit aux premiers stades de l'embryogenèse dans le cas de la gastrulation, mais également plus tard, lors de la formation de tissus tels que les ailes de la mouche (5)(6)(7).

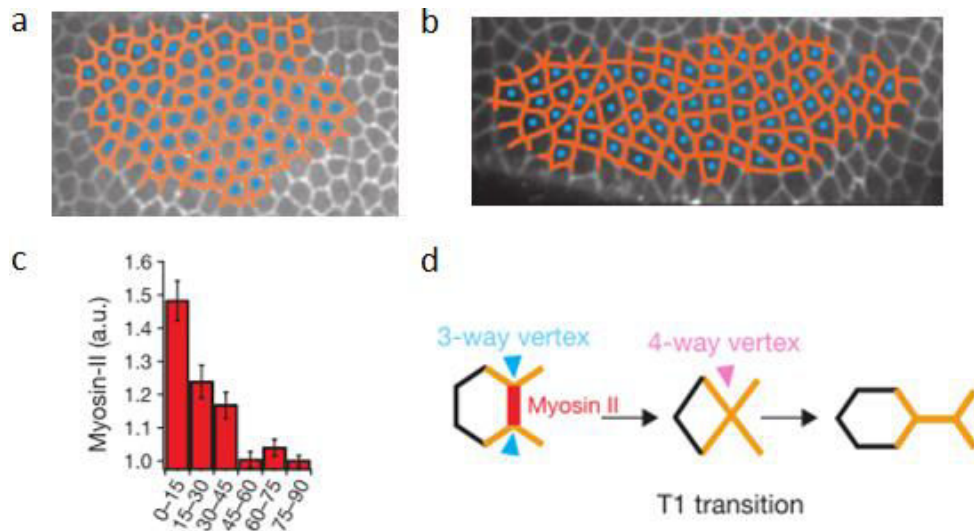


Figure 1-4 : Polarité et contraction de tissus chez la mouche. (a, b) Images de la bande germinale avant et 40 minutes après l'élongation du tissu. Taille caractéristique d'un bord de cellule : 5 μm . (c) Orientation de l'enrichissement en myosine II (en degré par rapport à l'axe vertical). (d) Schéma d'une transition de type T1 qui explique l'élongation du tissu. Images adaptées de (4).

A l'échelle d'un groupe, composé d'une dizaine à une centaine de cellules, la polarité joue également un rôle important. Si, dans ce groupe de cellule, certaines possèdent une motilité plus importante que leurs voisines, leur mouvement peut forcer les cellules voisines à s'orienter

et à migrer dans la même direction. Le comportement local de une à dix cellules dicte alors le comportement global (8). Cela a été observé récemment dans le cas de métastases où quelques cellules cancéreuses entraînent le déplacement d'un plus grand nombre de cellules hors de la tumeur initiale (Figure 1-5)(9)(10).

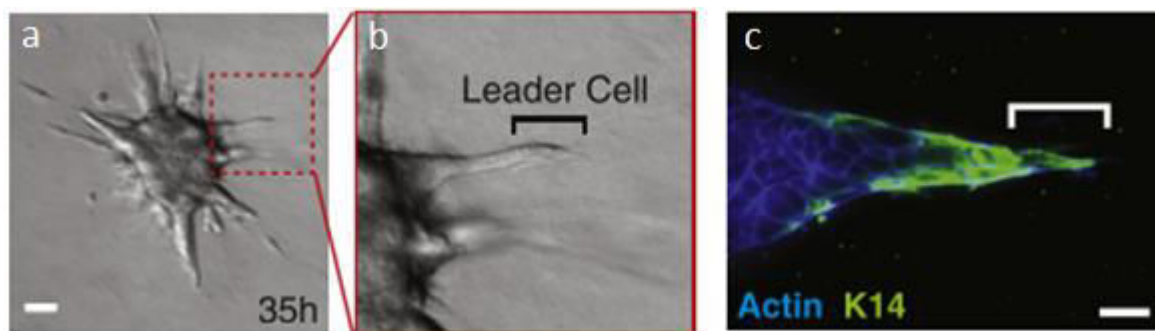


Figure 1-5 : Polarité et invasivité de cellules cancéreuses. (a, b) Image DIC d'un groupe de cellules extraites d'une tumeur mammaire et déposées dans une matrice de collagène. (a) Bar d'échelle : 50 μm . (b) Zoom sur une des protrusions se formant à la périphérie. (c) Image de fluorescence de l'actine (bleu) et de la protéine Cytokeratin 14 (K14) (en vert) marqueur du caractère invasif des cellules. Barre d'échelle : 20 μm . (a-c). Images adaptées de (9).

Comme nous venons de le voir sur trois exemples, un grand nombre de phénomènes sont regroupés sous la dénomination de polarité. Quelques soient le phénomène et l'échelle considérés, tous ont pour dénominateur commun une perturbation venant d'une asymétrie relative à la localisation d'un élément aux propriétés biologiques, chimiques et/ou physiques singulières. De plus, ces phénomènes possèdent tous une organisation axiale qui permet de maintenir un état globalement polarisé ou bien de modifier un état existant. Enfin, le temps caractéristique de cette polarisation est toujours supérieur au temps caractéristique de la perturbation car le système doit intégrer à l'échelle globale la perturbation locale, ce qui nécessite un couplage par des processus biochimiques et/ou physiques.

Dans cette thèse, nous considérerons la polarité à l'échelle de la cellule unique, tout en sachant que certaines des idées développées sont applicables à d'autres échelles. Nous aborderons en particulier le cas de la migration cellulaire et les contraintes qui y sont associées. Nous nous attacherons à mettre en avant les échelles spatiales et temporelles considérées et l'intégration temporelle de la perturbation. De plus, nous soulignerons les phénomènes se rapprochant de la définition physique de la polarité, c'est-à-dire lorsque les deux pôles possèdent des caractéristiques opposées.

1.1.2 Polarité et migration cellulaire

Axe avant/arrière

La migration cellulaire est un des phénomènes qui implique une polarité à l'échelle de la cellule unique. In vivo, de nombreux types cellulaires migrent à deux ou trois dimensions dans les organismes. C'est le cas par exemple des fibroblastes et des kératocytes qui migrent pour assurer la cohérence et la souplesse du derme et de la cornée. C'est également le cas des neutrophiles qui luttent contre les infections bactériennes. Bien que, dans le détail, ces types de migration soient différents du fait de l'histoire des cellules et de leur environnement, il est possible de trouver de nombreuses similitudes entre les processus impliqués. Dans le cadre de cette thèse, nous nous focaliserons sur l'étude de la migration de cellules à deux dimensions. Nous nous intéresserons en particulier au phénotype caractéristique de ces cellules lorsqu'elles sont déposées sur des substrats tels que des lamelles de microscopie, recouvertes de protéines d'adhésion fibronectine – une des protéines de la matrice extra cellulaire (Figure 1-6)(11)(12).

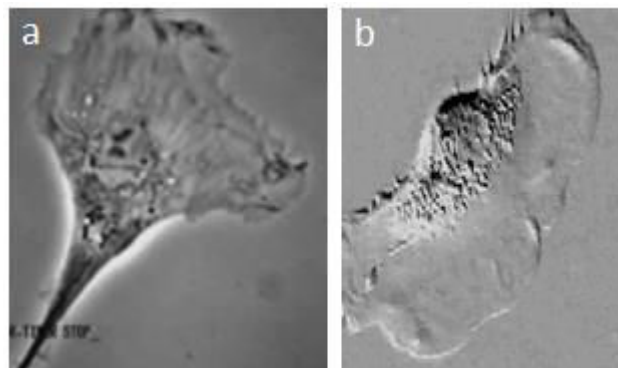


Figure 1-6 : Polarité avant/arrière de cellules en migration. Image DIC d'un fibroblaste NIH/3T3 (a) et d'un kératocyte (b) sur une lamelle de verre. Taille caractéristique de ces cellules : 60 μm . Source Google image.

Ces cellules, pendant la migration, possèdent un phénotype caractéristique : elles présentent une large protrusion, appelée lamellipode, dans la direction du mouvement, et une zone où la membrane se rétracte à l'extrémité opposée. Ces régions sont considérées respectivement comme l'avant et l'arrière de la cellule. Ce phénotype spécifique est directement lié à l'organisation cellulaire locale et à l'agencement des protéines qui la constituent. Enfin, la migration des cellules ne dépend pas directement de la présence d'un noyau et de la production de protéines. Des fragments de cytoplasmes de kératocytes peuvent, en effet, posséder le même phénotype de migration qu'une cellule (13).

Phénotype transitoire

Comme nous l'observons avec l'exemple d'un fibroblaste étalé sur une lamelle de verre (Figure 1-7), cette organisation n'est pas statique. Ces cellules ont parfois plus d'une zone d'activité ce qui les empêche éventuellement de migrer selon un axe précis, jusqu'à ce qu'un

des pôles prenne l'ascendant sur les autres (12). Ces différents pôles évoluent dynamiquement les uns par rapport aux autres et sont parfois intégrés par les cellules pour former un axe unique de polarité avant/arrière (Figure 1-7, c, d).

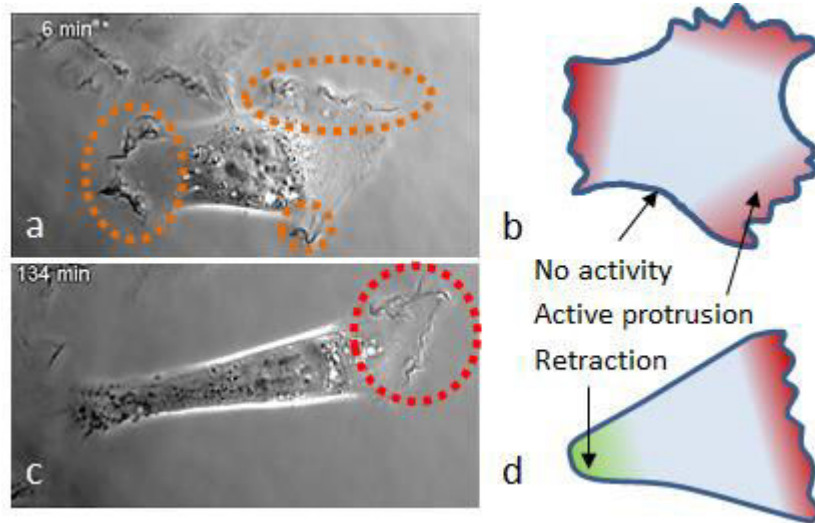


Figure 1-7 : (a, c) Image DIC d'un fibroblaste déposé sur une lamelle de verre et sur laquelle a été greffée de la fibronectine. Image prise 6 minutes et 2 heures après le début du film. Hauteur des images 40 μm . La présence de lamellipodes est soulignée par les ellipses en pointillés de couleur. (b, d) Schémas des phénotypes observés.

Organisation cellulaire

Cet état de polarisation ainsi que l'organisation interne le caractérisant ont été largement étudiés à partir des images de fluorescence des protéines et peuvent être schématisés comme sur la Figure 1-8 (14)(15). Cette polarité des cellules est principalement axée sur leur cytosquelette, en particulier sur les filaments d'actine. Il est à la base de leur phénotype et de leurs propriétés mécaniques (16)(17)(18).

Les filaments d'actine sont polymérisés sous deux structures distinctes. Ils forment, par exemple, de longues fibres de stress parallèles à l'axe de migration (19)(20). Ces fibres sont, de plus, enrichies en moteurs moléculaires tels que les myosines II, ce qui permet d'en augmenter la cohésion ainsi qu'exercer des forces sur celles-ci (21)(22). Elles prennent appui sur des points focaux d'adhésion (23) qui sont des complexes de protéines qui font le lien entre les protéines d'adhésion et le cytosquelette des cellules. Ces points focaux transmettent les forces intracellulaires jusqu'au substrat, par exemple pour entraîner la migration des cellules.

L'autre type d'actine présent dans ces cellules sont d'assez courts filaments possédant une structure branchée (24), retrouvés particulièrement à l'avant de la cellule dans le lamellipode, où ils sont nécessaires à la formation de protrusions (25).

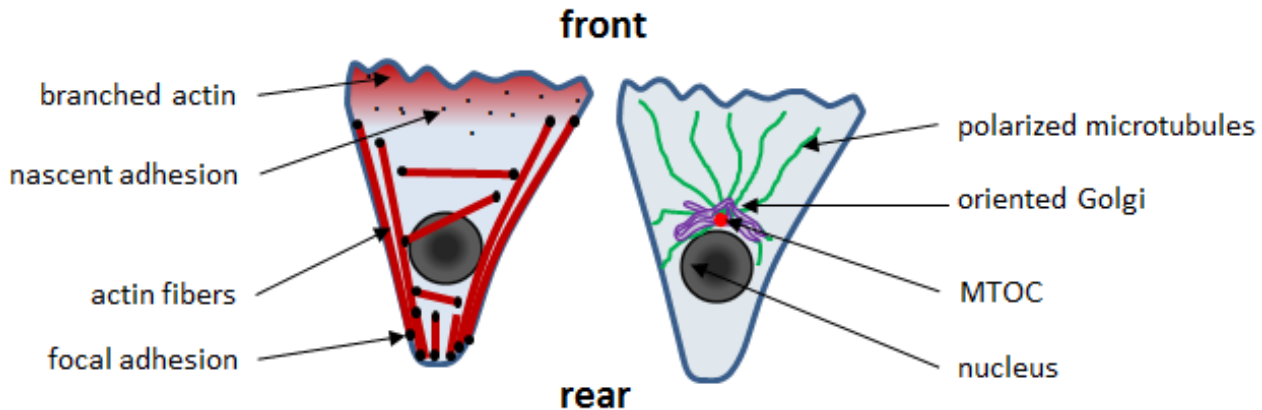


Figure 1-8 : Schéma de l'organisation moléculaire interne d'une cellule possédant une polarité avant/arrière.

Un autre élément important du cytosquelette sont les microtubules. Ce sont des fibres polaires (une extrémité + et une -) constituées de dimères de tubuline. Leurs extrémités positives sont regroupées au niveau du centrosome (MTOC) et partent dans toutes les directions, notamment vers la protrusion. Leur implication directe dans la création de force dans les cellules mammifères n'est pas particulièrement importante (16). Cependant, leur contribution indirecte à ce processus par le transport intracellulaire de vésicules est majeure (26). Dans le cas de la migration à deux dimensions, l'axe de polarité de la cellule est également très bien caractérisé par l'alignement du noyau, du centrosome et de l'appareil de Golgi de la cellule (27), ce qui en souligne l'implication.

Sensibilité à l'environnement

A l'échelle de la cellule, l'organisation interne des protéines est extrêmement importante et son contrôle n'est pas dû au hasard. Trois types cellulaires spécifiques, des fibroblastes, des lymphocytes T et des cellules épithéliales, bien que possédant les mêmes protéines, ne les organisent pas de la même manière. Cela tient du fait que l'environnement dans lequel elles se trouvent et que les tâches qu'elles doivent remplir sont différents (Figure 1-9).

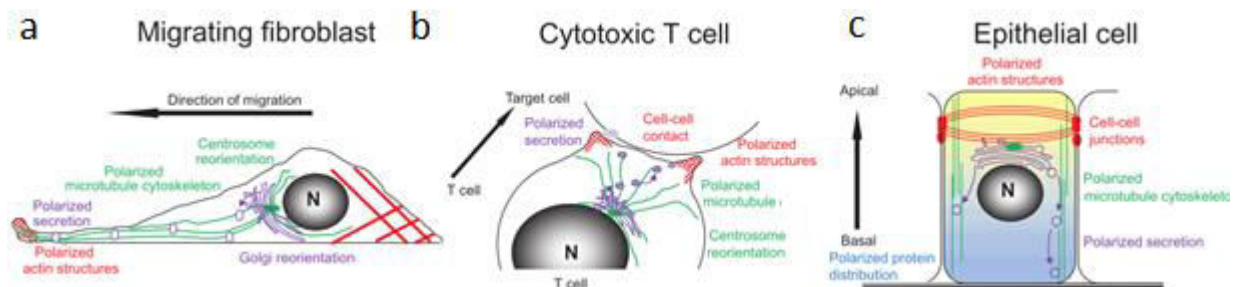


Figure 1-9 : Organisation interne des principaux éléments du cytosquelette en fonction du contexte cellulaire. (a) Fibroblaste en migration vu de côté. (b) Lymphocyte T vu de dessus. (c) Cellule épithéliale vue de côté.

La capacité des cellules à sentir leur environnement et celle de modifier leurs phénotypes au cours du temps ne sont pas indépendantes comme nous l'observons sur la Figure 1-10.

Un même type cellulaire peut, selon le contexte, changer son organisation en fonction des informations qu'il perçoit de l'environnement. Ce type de régulation est d'autant plus marqué que la cellule est spécialisée. Ainsi un neutrophile, dans son rôle de phagocytose des bactéries, réorganise de manière dynamique sa polarité avant/arrière, ce qui lui permet de suivre le déplacement des bactéries (Figure 1-10).

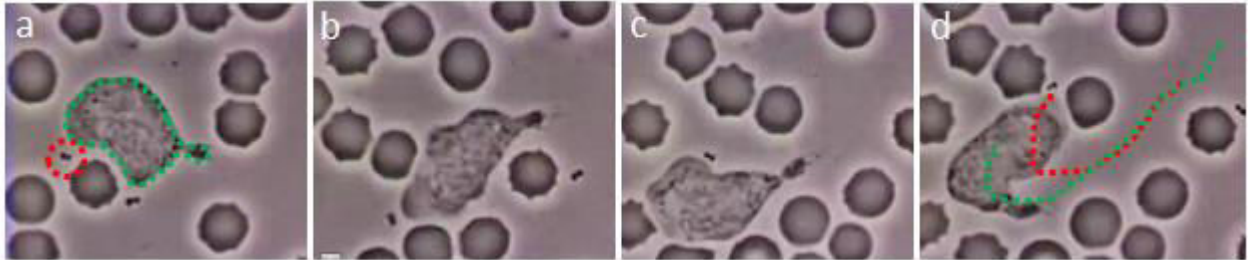


Figure 1-10 : (a-d) Images en lumière blanche d'un neutrophile et d'une bactérie parmi des globules rouges. Leur contour (a) et leur déplacement au cours du temps (d) sont repérés respectivement en vert et en rouge. Images tirées d'une vidéo intitulée *Neutrophil Chase* associée au livre « *Essential Cell Biology* »

Il existe donc des mécanismes modifiant, sur des échelles inférieures à la dizaine de micromètres, l'organisation interne des cellules. Ils sont sensibles à l'environnement dans lequel elles se trouvent et leurs permettent de s'orienter dans la direction d'un signal extérieur pour s'en rapprocher ou s'en éloigner selon le contexte (28). Ces mécanismes biochimiques sont de plus modifiables sur des échelles temporelles de la minute pour suivre l'évolution spatiale du signal (Figure 1-11).

Notre approche de l'étude de la polarité a donc été orientée vers la compréhension des réseaux de signalisation impliquant les signaux biochimiques qui génèrent ce type de phénotype.

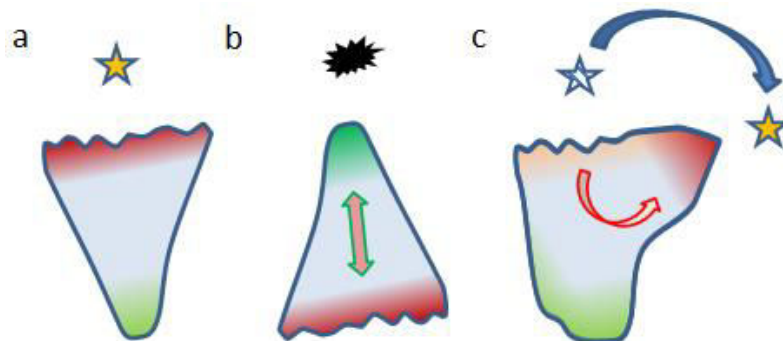


Figure 1-11 : Comportement cellulaire en fonction du contexte. (a) Création d'une protrusion dans la direction d'un signal chimioattractant. (b) Rétraction d'une cellule en réponse à la présence d'un signal répulsif. (c) Réorientation de l'activité cellulaire en fonction du déplacement d'un signal chimioattractant.

1.2 Les RhoGTPases et la migration cellulaire

La migration cellulaire se caractérise par une organisation dynamique contrôlée par des processus internes sensibles à des signaux externes. Il a été remarqué à la fin des années 1980 une classe de protéines spécifiques à la communication entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule : les protéines G. Elles ont été découvertes par Alfred G. Gilman et Martin Rodbel à qui fut décerné, en 1994, un prix Nobel à ce sujet. Parmi ces protéines, il existe une classe de petites protéines, appelées RhoGTPases présentes dans de nombreuses cellules eucaryotes, des levures aux cellules de mammifères et de plantes. Nous allons présenter ici leur mode de fonctionnement et souligner leur importance dans le contrôle de la régulation du cytosquelette lors de la migration cellulaire (29).

1.2.1 Les RhoGTPases

Le cycle d'activation des RhoGTPases

Les RhoGTPases sont des protéines qui utilisent une stratégie biochimique simple pour contrôler des processus moléculaires complexes. Elles cyclent entre deux états particuliers : un état dit actif, lorsqu'elles sont liées à une guanosine triphosphate (GTP) et un état inactif lorsqu'elles sont liées à une guanosine diphosphate (GDP). Dans l'état actif, les RhoGTPases reconnaissent et interagissent avec leurs protéines cibles (effecteurs)(30). Le passage de l'état inactif à l'état actif est catalysé par des *Guanine Exchange Factor* (GEF) et le retour à l'état inactif par des *RhoGTPase-Activating Proteins* (GAP) (Figure 1-12). Par ailleurs, ces protéines peuvent être bloquées dans leur état inactif et séquestrées dans le cytoplasme sous l'action de *Guanosine Nucleotide Inhibitors* (GDI)(31).

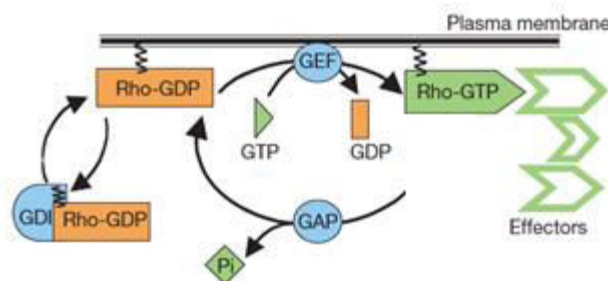


Figure 1-12 : Cycle biochimique des RhoGTPases. Figure adaptée de (30).

Les GEF sont des protéines constituées de deux types de domaines biochimiques (32)(33). Le premier les localise au bon moment et à la bonne place dans la cellule, comme dans le cas de la GEF Ect2 par exemple. Cette GEF, initialement localisée dans le noyau, est libérée dans le cytoplasme au moment de la division cellulaire et aide à la formation de l'anneau de contraction (34). Le deuxième type de région indispensable aux GEF est leur domaine DHPH. Il permet la reconnaissance et l'activation de RhoGTPases spécifiques, comme dans le cas du domaine DHPH

de Intersectin qui active spécifiquement Cdc42. C'est donc l'addition de ces deux types de régions qui est responsable du contrôle de l'activité spatiotemporelle des RhoGTPases par les GEF (32)(35).

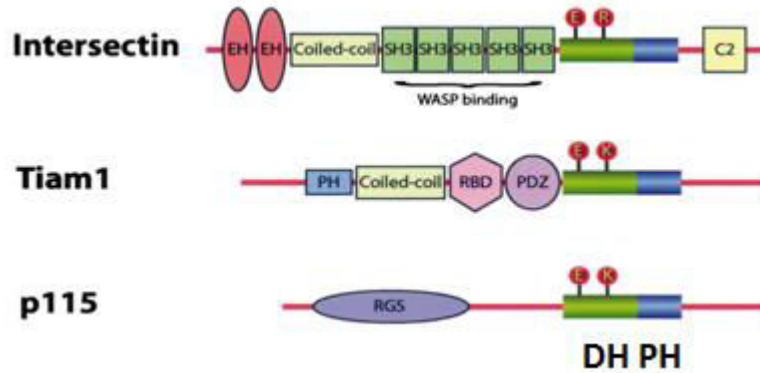


Figure 1-13 : Schéma de la structure en domaine des trois GEF Intersectin, Tiam1 et p115. Chacune de ces protéines est constituée d'une région DHPH et de régions d'interaction. Figure adaptée de (32).

Les RhoGTPases et l'organisation cellulaire

Historiquement, trois de ces RhoGTPases ont été largement étudiées : Rac1, Cdc42 et RhoA (36)(37). Au début des années 1990, des chercheurs ont été capables d'activer chacune des voies de signalisation spécifiques dans des cellules fibroblastes à partir de perturbations biochimiques externes (38). En comparant alors le phénotype obtenu avec le phénotype de cellules contrôles, cela a permis de prédire un rôle pour ces protéines, les éléments pris en compte étant la forme des cellules, la localisation de l'actine et des points focaux (Figure 1-14).

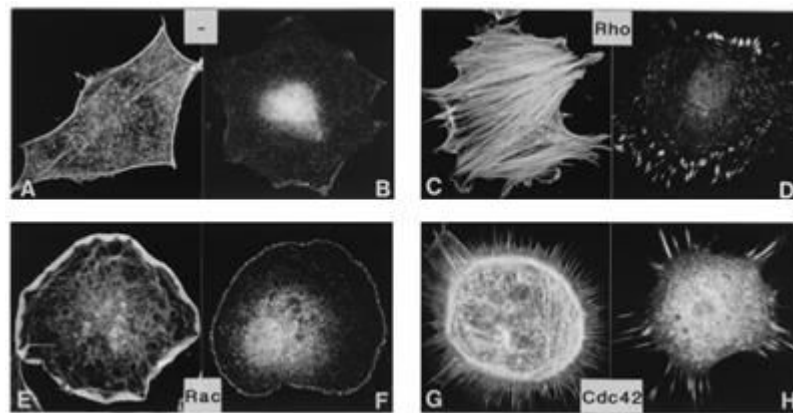


Figure 1-14 : Images de fluorescence du signal actine et vinculine (points focaux) dans des fibroblastes qui surexpriment RhoA (C, D), Rac1 (E, F) et Cdc42 (G, H). Figure adaptée de (38).

De cette manière, il a été découvert que RhoA régule la présence de fibres de stress enrichies en actine et en myosines et la formation de points focaux, Rac1 entraîne la formation de protrusions enrichies en actine sur les bords de la cellule mais ne contrôle pas la formation

de points focaux et enfin, Cdc42 entraîne la formation de filopodes et crée d'importants points focaux là où se sont accrochés les filopodes sur la lamelle.

Depuis ces découvertes, la biochimie et la génétique ont évoluées et il a été possible d'étudier de manière systématique les interactions entre ces protéines et leurs effecteurs. Désormais, une des méthodes principales consiste en la surexpression ou la suppression de ces protéines dans des cellules et l'observation des modifications biochimiques et des phénotypes générés. La complexité de ces réseaux a ainsi pu être mise à jour tel que dans le cas de Cdc42 (Figure 1-15).

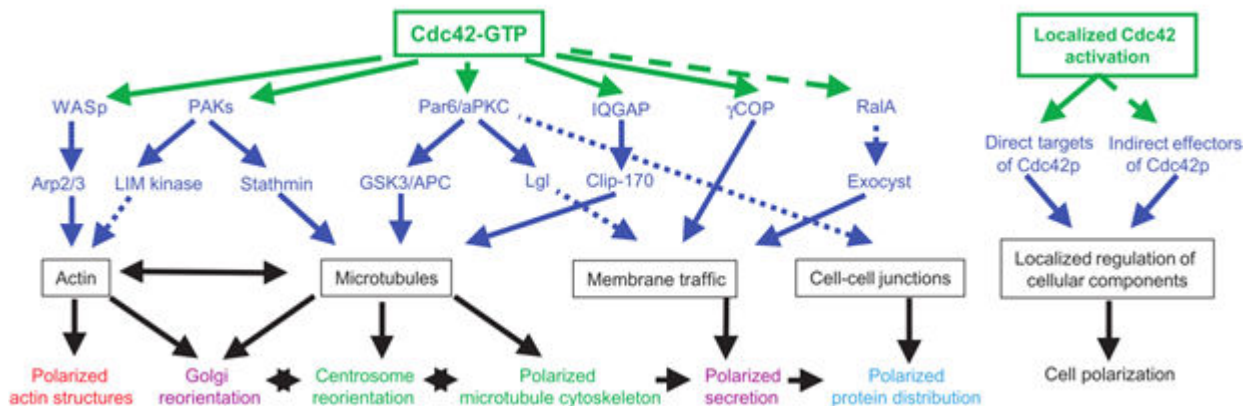


Figure 1-15 : Implication de Cdc42 dans la régulation de composants cellulaires. Schéma représentant les différentes voies de signalisation dans lesquelles un rôle de Cdc42 a été observé quant à la polarisation cellulaire. Figure adaptée de (39).

Une telle approche permet d'obtenir des indices sur les protéines impliquées en aval d'une RhoGTPase et de comprendre son implication dans différentes fonctions cellulaires. Cependant, elle ne tient pas compte de deux éléments. Le premier est le contexte cellulaire, en effet, ce type de résultat est obtenu à partir de moyennes sur des populations de cellules et ne considère aucun état particulier. Or les cellules ne sont pas polarisées en permanence et ont parfois plusieurs régions d'activité cellulaire en même temps sans être globalement polarisées. Ces protéines ayant des activités à l'échelle subcellulaire, il faut étudier les phénotypes à cette même échelle.

Le deuxième élément à prendre en compte concerne la manière dont sont effectuées ces expériences et le fait que les réseaux de signalisation ne sont pas des systèmes réversibles à l'équilibre. Dans un tel système, retirer une protéine du réseau entraîne un état qui est proche de l'état d'équilibre précédent (Figure 1-16, a). Cependant, ce n'est pas le cas des réseaux génétiques en biologie dont les réactions sont souvent irréversibles. La suppression ou la surexpression d'une protéine, dans ce type de système, le pousse parfois dans un nouvel état d'équilibre, très différent de l'état naturel (Figure 1-16, b). Ce changement d'état n'ayant alors

aucune correspondance avec le rôle de la protéine elle-même. Les déductions tirées de la comparaison entre deux états donnés sont donc parfois fausses.

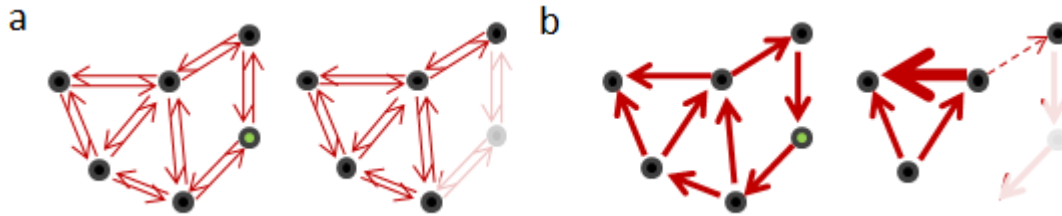


Figure 1-16 : Schéma d'un réseau de signalisation à l'équilibre thermodynamique (a, gauche) et hors équilibre mais dans un état stationnaire (b, gauche). Si un nœud (en vert dans (a, b)) est retiré de ces réseaux, nous obtenons respectivement les réseaux (a, droite) et (b, droite).

Ces études réalisées sur des colonies de cellules fixées ne tiennent pas compte du détail dynamique de l'organisation cellulaire voir subcellulaire qui est une des clés de la migration cellulaire. De plus, pour que les modifications de phénotype observées soient biologiquement pertinentes, il faut s'assurer de travailler à des niveaux d'expressions de protéines de l'ordre de ceux endogènes - ce qui est difficile à réaliser lors de surexpressions génétiques.

1.2.2 Modules de RhoGTPases

A partir du schéma de la Figure 1-17, nous observons que Rac1 et Cdc42 sont responsables de la polymérisation d'actine branchée à partir de l'activation de Arp2/3 (40)(41). RhoA entraîne la polymérisation d'actine par l'activation des formines mDia et une augmentation de l'activation des myosines par (42) (43)(44).

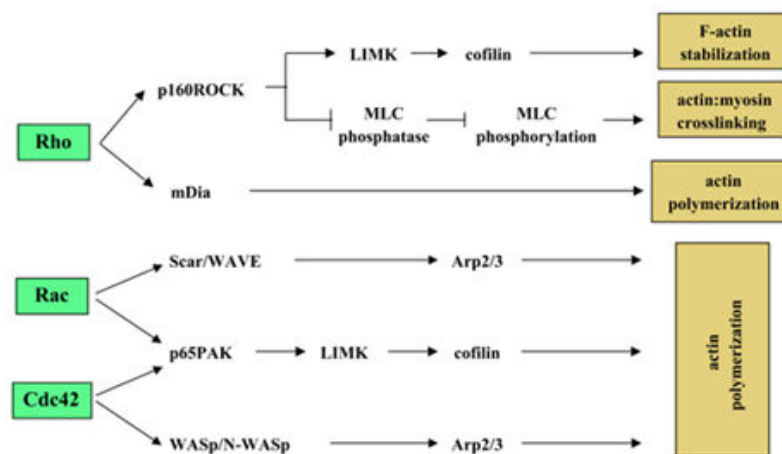


Figure 1-17 : Réseaux de signalisation associés aux RhoGTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 relatifs à la polymérisation d'actine et à l'activité des myosines. Figure adaptée de (40).

Cependant ce type de schéma ne tient pas compte de la complexité réelle de ces réseaux de signalisation (Figure 1-18). Les récepteurs de la cellule sensibles à l'environnement extérieur modifient localement l'activité des RhoGTPases. Ces RhoGTPases recrutent et activent leurs

effecteurs. Ces effecteurs réorganisent le cytosquelette et les interactions qu'il a avec d'autres protéines telles que les myosines et les points focaux d'adhésion. Cela modifie alors l'organisation locale de la cellule et entraîne une réorganisation de la morphologie cellulaire. La modification de la localisation ou de l'activité de tous ces éléments étant à l'origine de rétroactions sur les signaux en amont. La polymérisation locale de microtubules, par exemple, peut changer la quantité de vésicules transportées dans une région précise et ainsi modifier la concentration locale de RhoGTPases ce qui modifie la stabilité des microtubules à l'origine de la perturbation.

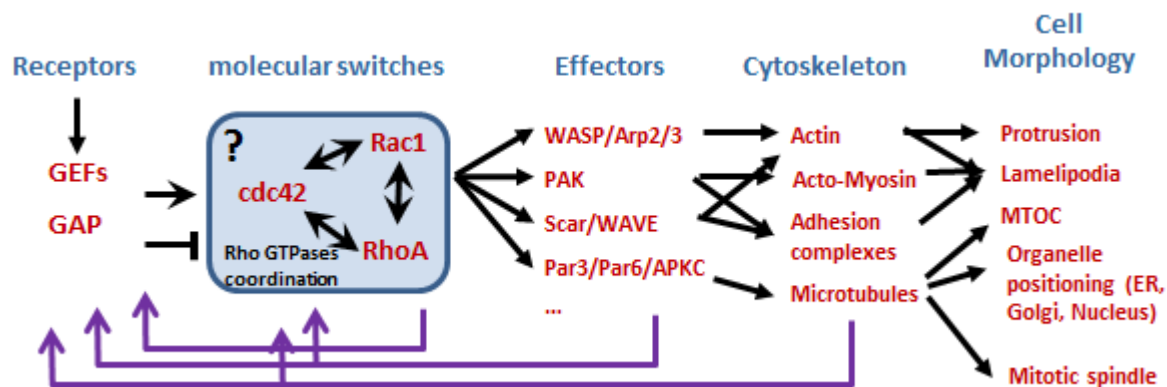


Figure 1-18 : Schéma présentant les différents niveaux de régulation des voies de signalisation des RhoGTPases.

Bien qu'imparfaites, ces études déterminant le rôle des protéines une à une ont permis une meilleure compréhension de l'implication des RhoGTPases dans la polarité cellulaire. En recoupant les connaissances sur ces trois RhoGTPases avec celles sur la migration cellulaire, il a été proposé un rôle et une organisation spatiotemporelle des différents réseaux de signalisation. La contrainte étant de réussir à expliquer la polarité avant/arrière à partir de la possibilité de remodeler le cytosquelette (45)(46). Les cellules présentent, à l'avant, une activité importante de Cdc42 et de Rac1 contrôlant la protrusion et, à l'arrière, une activité importante de RhoA contrôlant la contraction et la rétraction de celles-ci.

La polarité globale des cellules en migration est donc définie par l'organisation du réseau de signalisation complexe dont les éléments-clés sont les RhoGTPases. Cependant, ce réseau n'est pas activé de manière homogène dans la cellule du fait d'une organisation initiale différente des effecteurs et du cytosquelette ainsi que d'une activité spatiale différente des GAP et GEF. De plus, cette activité subcellulaire est parfois biaisée par des interactions entre RhoGTPases elles-mêmes et par des signaux externes à la cellule. Par ailleurs, cette activité des RhoGTPases doit évoluer spatialement dans la cellule au cours du temps pour suivre l'évolution spatiale des signaux biochimiques extérieurs.

1.2.3 Observation des RhoGTPases

Un élément-clé limitant une meilleure compréhension de l'intégration des RhoGTPases dans la migration cellulaire était l'impossibilité d'en observer la localisation et l'activité au cours du temps. Une surexpression des RhoGTPases, elles-mêmes, dans les cellules, ne permet pas une bonne visualisation de leur activité. En effet, à un instant donné, 50 à 90 pourcent des RhoGTPases sont inactives dans les cellules en migration (47), ce qui signifie qu'il n'est pas possible de différencier le signal d'intérêt - la localisation des RhoGTPases actives - du bruit - les RhoGTPases inactives. Des méthodes ont donc été développées pour surmonter ces difficultés et observer uniquement ces protéines dans leur état actif.

Sondes d'activité des RhoGTPases

La première technique développée consiste à coupler les domaines d'interactions de certains effecteurs des RhoGTPases à des fluorophores. L'activité des RhoGTPases est alors révélée par le recrutement local de ces protéines (Figure 1-19, a). Ce système n'est cependant pas parfait. Si les cellules expriment plus d'effecteurs fluorescents que les RhoGTPases ne peuvent en recruter alors le signal n'est pas distinguable du bruit. De plus, si un grand nombre de ces domaines d'interaction est exprimé par les cellules, cela peut titrer les RhoGTPases et diminuer la quantité d'effecteurs endogènes activés ce qui modifie le phénotype cellulaire global.

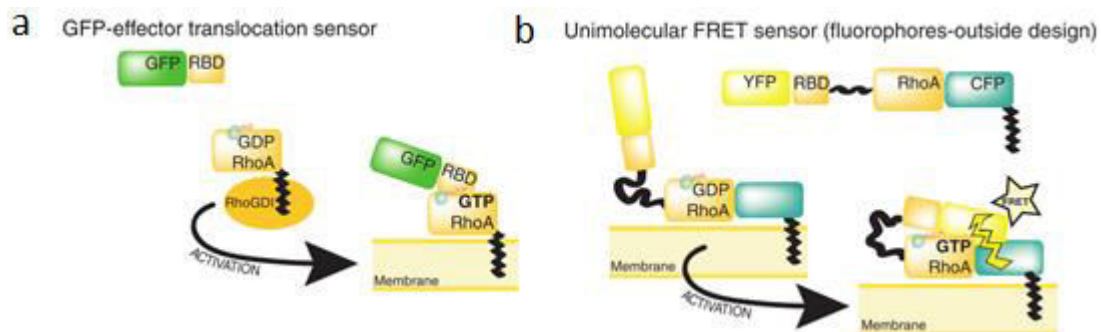


Figure 1-19 : Sondes d'activité des RhoGTPases. (a) Effeteur fluorescent des RhoGTPases. (b) Sonde de FRET pour l'observation de l'activité des RhoGTPases. Figure adaptée de (48).

Depuis, une autre stratégie a été développée qui augmente de manière significative le rapport signal sur bruit de la mesure d'activité des RhoGTPases (Figure 1-19, b). Cette technique est basée sur des techniques de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (49). Lorsque la protéine fluorescente CFP est éclairée (*Cyan Fluorescent Protein*) avec une lumière de longueur d'onde proche de 430 nm, elle émet de la lumière autour de 470 nm. Cette émission est suffisante pour exciter les protéines YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) à proximité qui émettent alors de la lumière autour de 530 nm, et cela avec une probabilité d'autant plus grande que ces protéines sont proches spatialement (50).

La technique développée consiste en la création d'une protéine de fusion entre une RhoGTPase et le domaine d'interaction d'un de ses effecteurs. A chaque extrémité de cette protéine est fixé une des deux protéines du couple de FRET. Lorsque RhoA (Figure 1-19) devient actif, il interagit avec le domaine d'interaction de Rhotekine (RBD), un des effecteurs de RhoA. Lors de cette interaction, les deux extrémités de la protéine seront plus proches et le signal de FRET augmente ce qui est observable sur un microscope. Dès lors, l'activité des RhoGTPases est observable dans les cellules, sans être gêné par les RhoGTPases non actives. De plus, l'interaction entre RBD et RhoA ayant une faible durée de vie, il est possible de suivre les réorganisations spatiales de RhoA au cours du temps.

Polarité des RhoGTPases

Les caractéristiques spatiotemporelles du signal RhoA ont été déterminées à partir de ce type d'observation (Figure 1-20). Dans le cas de la migration de fibroblaste sur fibronectine, cette RhoGTPase n'est pas uniquement présente à l'arrière de la cellule pour générer de la rétraction. Elle est activée dans d'autres contextes cellulaires tels que lors de la formation de protrusions, lors de la formation de vésicules de macro-pinocytose et lors de la rétraction de vague de membrane (Figure 1-20).

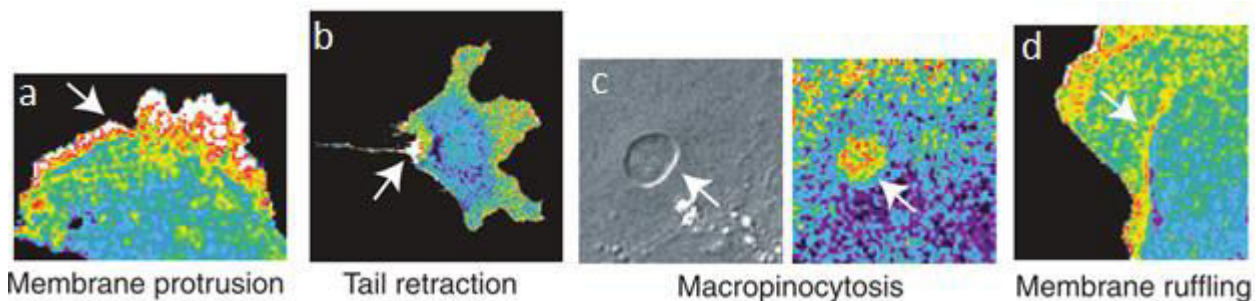


Figure 1-20 : Localisation de RhoA-GTP dans des fibroblastes. Cette protéine est observée dans les protrusion (a), au niveau des zones de rétraction à l'arrière de la cellule (b), au niveau de macro vésicules (c) ainsi qu'au niveau de la rétraction de protrusion (d). Figure adaptée de (48).

Par ailleurs, il est possible de quantifier l'activité des RhoGTPases au cours du temps le long du bord de la cellule. Cependant, une seule RhoGTPase est observable à la fois. La définition d'une référence temporelle est donc nécessaire pour comparer les activités des différentes RhoGTPases entre elles. Cette référence peut être, par exemple, le phénomène de protrusion/rétraction des membranes. La corrélation de cette activité le long du bord de la cellule à l'activité de RhoGTPase présente un patron d'interaction précis (Figure 1-21, d). Il a été ainsi déterminé que, dans le cadre des protrusions, il existe un délai de 40 secondes entre le signal de Rac1/Cdc42 et l'activité de RhoA. De plus, ces signaux sont anticorrélés ce qui pourrait être expliqué par une inhibition de RhoA par Rac1 par exemple.

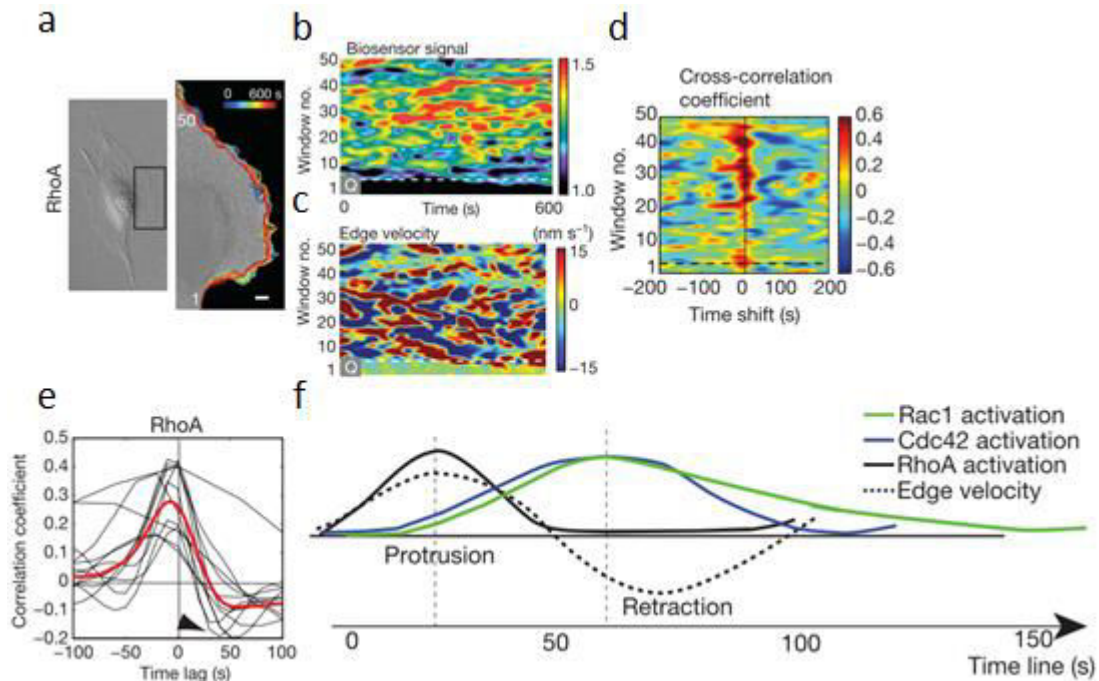


Figure 1-21 Corrélations de l'activité des RhoGTPases. (a) Image DIC d'une cellule déposée sur une lamelle. (b, c) Patrons d'activité de RhoA (b) et du mouvement de la membrane (c) sur le bord d'une cellule au cours du temps. (d) Corrélation entre activité de RhoA et vitesse de la membrane. (e) Moyenne des corrélations RhoA/vitesse des protrusions. (f) Schéma représentant l'activité des différentes RhoGTPases au bord de la membrane en fonction des phases de protrusion et de rétraction. Figure adaptée de (51).

D'après les auteurs de cet article (51), le rôle de RhoA dans ce système pourrait être de polymériser de l'actine via les formines et de réorienter localement les microtubules ce qui permettrait alors un enrichissement actif en Rac1. Dans ces expériences, il a été observé que RhoA est localisée aux bords de la membrane dans une région de 2 μm d'épaisseur alors que Rac1 et Cdc42 sont plus en retrait par rapport aux bords de celle-ci. La localisation de ces deux RhoGTPases pourrait être utile à la maturation des points focaux d'adhésion nécessaires à la migration cellulaire.

1.2.4 Contrôle de la polarité cellulaire

Comme nous venons de le voir, la polarité cellulaire est dépendante de l'activité des RhoGTPases et de l'organisation interne de la cellule. Le développement des sondes de FRET a révélé la dynamique de l'activité des RhoGTPases et montré ainsi la complexité des mécanismes dans lesquels sont impliquées RhoA, Rac1 et Cdc42. Les nouveaux enjeux dans ce domaine de recherche est le développement de méthodes simples et reproductibles pour contrôler l'activité de ces RhoGTPases dans le but de comprendre leurs régulations précises.

Micropatrons

Une des techniques développée récemment se base sur la faculté des cellules à réguler l'activité des RhoGTPases en fonction des caractéristiques du substrat (52). Le principe de cette technique est de fabriquer des lamelles recouvertes d'un polymère empêchant les adhésions partout, sauf sur des zones où a été greffée de la fibronectine. Sur une lamelle, il est possible de créer des milliers de ces zones à la géométrie parfaitement contrôlée (patrons) en parallèle. Lorsque des cellules sont déposées dessus, elles s'étalent pour prendre une forme contrainte par la répartition de la fibronectine. Ce sont alors les contraintes mécaniques créées par la forme des patrons et par la rigidité du substrat qui sont intégrées par la cellule pour générer une organisation spatiale spécifique (53)(54). Par exemple, une cellule sur un patron de type arbalète (Figure 1-22, a) crée de manière reproductible une polarité avant/arrière (Figure 1-22, b-f).

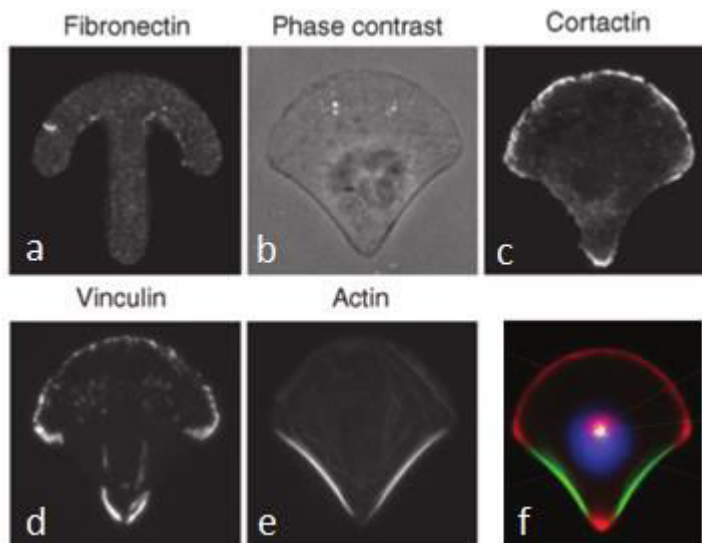


Figure 1-22 : Polarité d'une cellule sur patron arbalète. (a) Patron de fibronectine de forme arbalète. (b-e) Image d'une cellule sur ce patron en contraste de phase (b) et fluorescence de l'actine corticale (c), des points focaux d'adhésion (d) et de l'actine filamenteuse (e). (f) Image de fluorescence moyennée sur approximativement soixante-quinze cellules pour chaque composant de l'organisation cellulaire. En rouge, l'actine corticale et le Golgi, en bleu le noyau et en vert l'actine filamenteuse. Figure adaptée de (55).

Ces expériences montrent la localisation de plusieurs signaux de fluorescence relatifs à l'actine filamenteuse, l'actine corticale et les points focaux d'adhésion par exemple. Ces observations, effectuées en parallèle sur des dizaines de cellules ayant un phénotype très proche, donnent une carte de leur organisation moyenne. Ainsi, l'actine corticale est concentrée à l'avant et à l'arrière des cellules, les bords non adhérents étant eux enrichis en fibres de stress s'appuyant sur des zones riches en points focaux d'adhésion. Cette structure contraint également l'organisation des microtubules, du noyau et du Golgi de la même manière que ce qui a pu être rapporté pour des cellules en migration (56)(57)(27).

L'utilisation de micropatrons est une méthode intéressante pour contrôler la polarité cellulaire. Cependant, bien qu'il commence à être développé des patrons dont la forme est modifiable au cours du temps (58), elle reste très statique et ne permet pas l'observation de la réorganisation des effecteurs des RhoGTPases. Le deuxième problème de cette approche est que les RhoGTPases ne sont pas activées directement mais par l'intermédiaire de protéines en amont dans les réseaux de signalisation.

Microfluidique

Les cellules étant sensibles à leur environnement, elles peuvent se diriger selon des gradients de molécules par des processus de chimiotaxie. En couplant la microfluidique et le chimiotactisme, il est possible de forcer la migration cellulaire (59) sur un grand nombre de cellules en parallèle et ce dans une direction donnée. Ce type d'approche crée une activation asymétrique de récepteurs membranaires qui est intégrée à l'échelle de la cellule pour réguler l'activité des RhoGTPases.

Il a été récemment publié (60) la possibilité de forcer la polarisation d'une cellule en court-circuitant l'activité des récepteurs externes et en contrôlant directement l'activité de Rac1. Les cellules de cette étude expriment initialement deux protéines : FRB (61) à la membrane et FKBP dans le cytoplasme. Lors de l'ajout de la molécule Rapamicyne (Rap), un complexe entre ces deux protéines se forme (Figure 1-23).

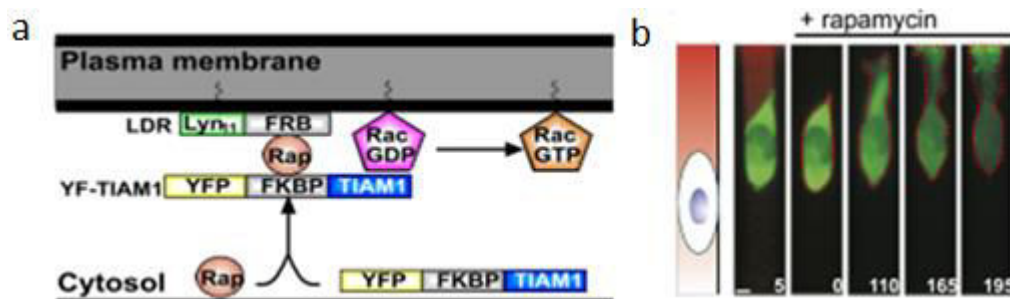


Figure 1-23 : Système FKBP/FRB pour forcer la migration cellulaire par l'activation locale de Rac1. (a) Schéma de principe du recrutement à la membrane de TIAM1 et de l'activation de Rac1 en présence de Rap. (b) Phénotype observé en présence d'un gradient de Rap dans des canaux microfluidiques. Le temps exprimé sur (b) est en minute après le début de la création du gradient. Figure adaptée de (60)

La protéine FKBP, fusionnée à un activateur de Rac1 (la GEF Tiam1), est recrutée à la membrane en présence de Rap et active Rac1. Lorsque ces cellules sont placées dans des canaux microfluidiques et soumises à des gradients de Rap, des gradients intracellulaires de Tiam1 sont formés et Rac1 est activé localement. Le contrôle direct de l'activité de Rac1 entraîne alors la formation de protrusions et une migration des cellules dans la direction du gradient, dans un délai d'une heure et demi environ.

Cette méthode a démontré la possibilité de contrôler la migration de cellules par le contrôle direct de Rac1. Elle présente cependant trois inconvénients principaux. Elle ne permet de créer qu'un seul axe de polarité, selon l'axe des canaux microfluidiques. Il est donc impossible, par exemple, de regarder la compétition entre deux perturbations perpendiculaires. Par ailleurs, le système est très limité par la dynamique de dimérisation/dissociation du complexe FRB-FKBP, beaucoup plus lente que les 1 à 2 minutes relatives aux oscillations d'activité des RhoGTPases. Enfin, il n'a pas été démontré avec ce système la possibilité de contrôler précisément le niveau de recrutement de Tiam1 et donc de RhoGTPases activées.

1.3 Contrôle optogénétique de l'activité cellulaire

Comme il a été mis en avant à l'aide de sondes de fluorescence, la polarité des cellules en migration dépend de l'activité asymétrique des RhoGTPases. Cette activité et l'organisation qui en découle sont désormais contrôlables par les scientifiques, cependant ces techniques de micropatron et de microfluidique ont des caractéristiques ne permettant pas d'étudier en détail les processus dynamiques en jeu.

Pour pallier aux difficultés énoncées, les chercheurs ont dû développer un outil permettant d'activer les RhoGTPases directement et ce avec des caractéristiques spatiotemporelles comparables à celles observées *ex vivo/in vivo* avec les rapporteurs de FRET. Cela semble désormais possible à l'aide d'outils optogénétiques (62), techniques développées initialement dans le cadre de la Neurobiologie mais qui ont évolué pour répondre aux exigences liées au contrôle de l'activité de Rac1, Cdc42 et RhoA.

1.3.1 Contrôle optogénétique de l'activité de récepteurs membranaires

L'idée du contrôle de l'activité de réseaux de signalisation par la lumière est née de l'observation que certains organismes, en particulier l'algue *Chlamydomonas Reinhardtii*, se comportent différemment selon l'absence ou la présence de lumière (Figure 1-24).

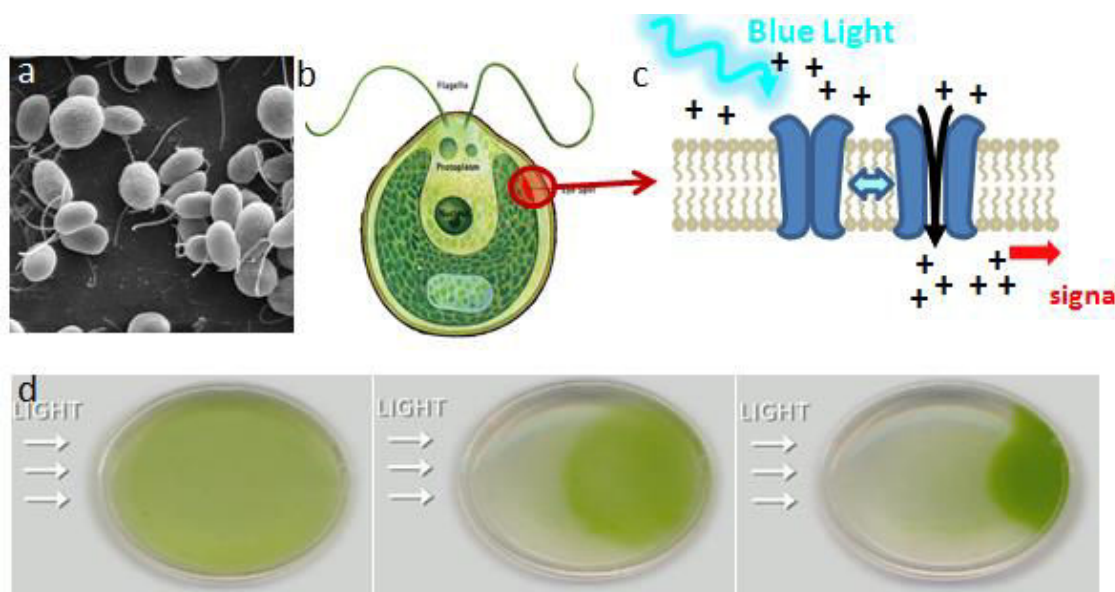


Figure 1-24 : *Chlamydomonas Reinhardtii* et son interaction avec la lumière. (a) Image de microscopie électronique de ces algues. Elles possèdent une région photosensible mise en avant par la zone rouge en (b). (a, b) Source : Google image. (c) Schéma de l'effet de la lumière sur les canaux ioniques photosensibles de cette algue. (d) Images extraites d'un film montrant la réorganisation spatiale de ces algues dans une boîte de pétri, de la lumière étant envoyée de la gauche. Images extraites d'une vidéo hébergée sur le site du journal Nature.

Un récepteur membranaire de cette algue a la capacité de changer de conformation sous l'action de lumière (Figure 1-24, c). Ce changement de conformation entraîne l'ouverture de ce canal ionique ce qui force l'entrée de protons dans certaines cellules de cet organisme. Les protons activent alors des moteurs moléculaires contrôlant l'activité de cette algue, ce qui en modifie la mobilité (Figure 1-24, d).

Ces expériences sont à l'origine d'un nouveau domaine de la biologie : l'optogénétique - le terme étant relatif à l'utilisation de la lumière (*opto*) sur des protéines photosensibles exprimées directement par les cellules (*génétique*). L'intérêt de cette technique est qu'à partir du moment où les cellules expriment ces protéines photosensibles, il n'y a plus de modification à apporter comme l'ajout de drogue ou la modification du substrat. Par ailleurs, elle est non invasive puisque basée sur l'utilisation de lumière, ce qui (en restant à des puissances lumineuses faibles) ne dégrade pas les cellules au contraire des autres techniques existantes telles que l'utilisation d'électrodes métalliques en Neurobiologie.

Certaines de ces protéines photosensibles ont été modifiées génétiquement pour contrôler la décharge de potentiel d'action dans les neurones. Les cellules qui les expriment déclenchent ainsi des potentiels d'action lorsqu'ils sont soumis à de la lumière (Figure 1-25, b) (63). De la même manière, en utilisant des protéines aux propriétés proches, il est possible au contraire de bloquer l'activité de neurones en les illuminant (64).

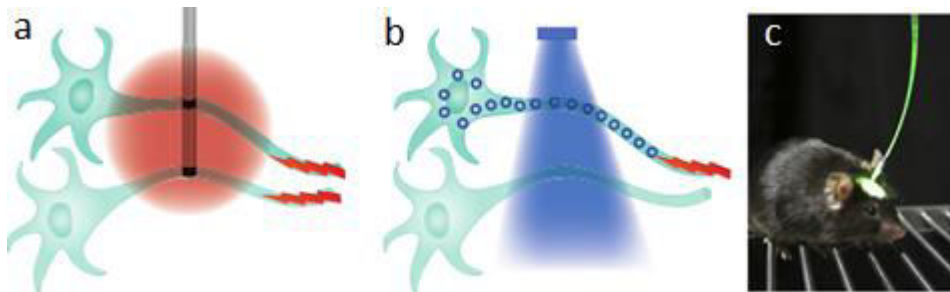


Figure 1-25 : Principe de l'optogénétique. Contrôle de l'activité de décharge de neurone à l'aide d'électrode (a) ou en éclairant les neurones avec de la lumière (b). Seuls les neurones ayant intégré le système optogénétique déchargent leurs potentiels d'action. (c) Image d'une souris ayant incorporé dans son système neuronal un système optogénétique. Ce système est activé par l'envoi de lumière à travers une fibre optique implantée dans son crâne. Figure adaptée de (64) et (65).

En mettant la production de ces protéines sous le contrôle de promoteurs liés aux neurones implantés dans l'aire du mouvement du cerveau de souris, il est possible d'en contrôler le comportement (Figure 1-25). Elles se mettent ainsi à courir lorsque que leur cerveau est soumis à de la lumière. Ces protéines contrôlent donc l'activité cellulaire à l'échelle d'une cellule dans un groupe de cellules avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde, limitée principalement par les propriétés spatiotemporelles de la protéine photosensible et du dispositif de microscopie utilisés. Couplées à l'observation en temps réel des décharges de potentiels d'action, grâce à des sondes de fluorescence ou des électrodes,

elles permettent d'observer la transduction des signaux électriques le long des réseaux neuronaux.

1.3.2 Contrôle de l'activité cellulaire par la lumière

Ces expériences de Neurobiologie ont mis en avant les possibilités de tels systèmes sous le contrôle de la lumière. Il a donc été recherché, parmi les organismes connus, des protéines photosensibles dans le but de contrôler les réseaux de signalisation impliqués dans la migration cellulaire.

Principe théorique

Deux stratégies principales ont été envisagées pour contrôler l'activité de protéines dans les cellules (66). La première approche concerne, comme en Neurobiologie, l'utilisation de protéines dont l'activité est directement dépendante de la présence de lumière. Dans ce cas, lorsque ces protéines sont éclairées, elles changent de conformation et leur site actif devient accessible (Figure 1-26, a).

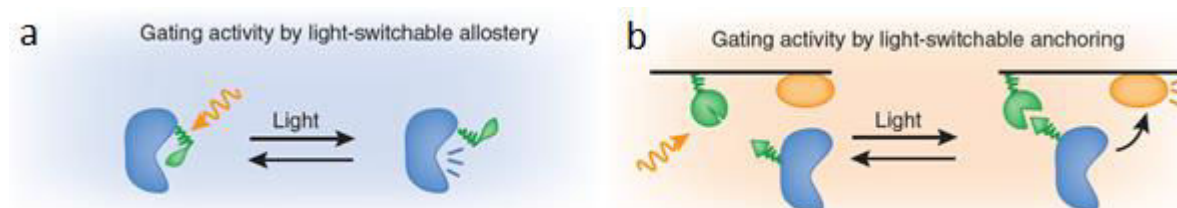


Figure 1-26 : Outils optogénétiques. (a) Schéma de l'interaction avec la lumière d'une protéine (en bleue) sous le contrôle d'un domaine photosensible (en vert). (b) Schéma du contrôle par la lumière du recrutement d'une protéine d'intérêt (en bleu) à la membrane grâce à la formation d'un dimère (en vert). Figure adaptée de la review (66).

La deuxième approche est basée sur la capacité d'interaction entre deux protéines, l'une photosensible et l'autre pas. En présence de lumière, la conformation de la première protéine change, ce qui autorise son interaction avec la deuxième. Si la protéine photosensible est localisée au niveau d'une structure spécifique dans la cellule, cela recrute son partenaire au même endroit. Ce partenaire ne possède pas d'activité de signalisation par lui-même mais, couplé à une protéine d'intérêt et illuminé par la lumière, il en change la localisation et rend possible son interaction avec les protéines environnantes (Figure 1-26, b).

Un inconvénient de ces méthodes est lié à la diffusion des protéines. Après avoir envoyé de la lumière localement dans une cellule, les protéines activées diffusent dans celle-ci et élargissent la zone d'activité. Ce phénomène peut être limité dans le cas de l'utilisation de systèmes optogénétiques réversibles par la lumière. Si l'interaction entre ces molécules est inhibée à d'autres longueurs d'onde, envoyer de la lumière activatrice localement dans les

cellules et de la lumière désactivatrice partout ailleurs restreint l'activation à la région d'intérêt (Figure 1-27).

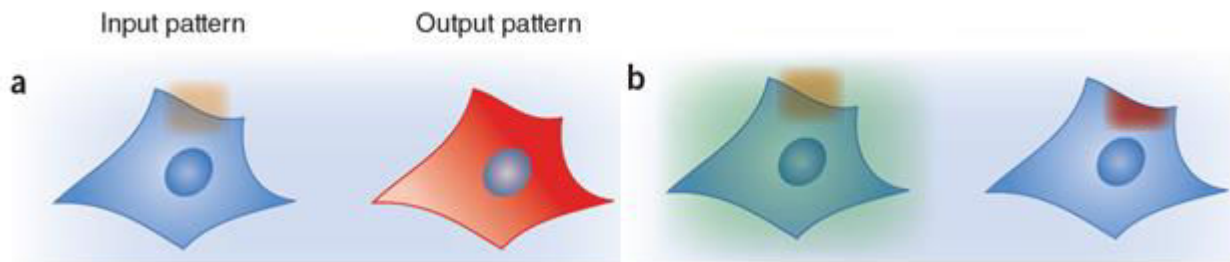


Figure 1-27 : Distribution d'activité cellulaire en fonction de l'illumination. (a) Expérience d'optogénétique où nous illuminons localement une cellule (en bleu), dont la réponse (en rouge) tient compte de phénomène de diffusion élargissant spatialement le signal d'entrée (en orange). Lorsque la désactivation du système est contrôlée par la lumière (b) des patrons d'activité beaucoup plus contraints spatialement sont générés. Figure adaptée de la review (66).

Ces systèmes optogénétiques contrôlent la distribution spatiotemporelle de l'activité de protéines et sont d'autant plus précis qu'ils sont sensibles à la quantité de lumière envoyée et qu'ils créent des activations à l'échelle subcellulaire. Ils permettent de tester, par exemple, la possibilité d'activer en même temps une région possédant déjà une activité cellulaire et une autre de la même taille mais sans activité initiale (Figure 1-28). D'autres paramètres, tels que la durée de la perturbation, ainsi que son étendue spatiale, peuvent être testés pour étudier l'importance relative et la compétition de différents patrons d'activation des RhoGTPases.

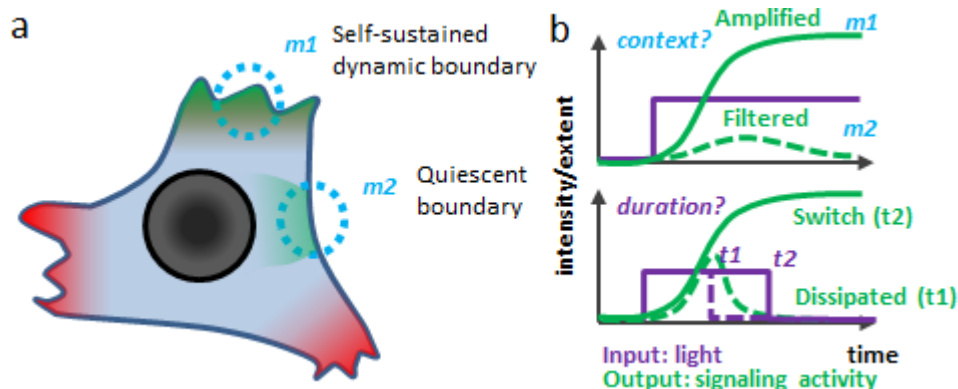


Figure 1-28 : Réponse cellulaire en fonction des caractéristiques d'illumination. (a) Schéma d'une cellule dont deux régions au contexte différent sont activées. (b) Schéma de l'influence théorique sur l'activité de la cellule du contexte cellulaire ainsi que de la durée, de l'intensité et de l'extension du pulse de lumière.

Contrôle local de l'activité de Rac1

Dans la nature, certaines protéines photosensibles régulent naturellement des voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire. Par exemple, envoyer de la lumière sur des protéines de la famille des opsines modifie leur activité. Dans leur état actif, ces molécules activent localement la voie de signalisation impliquant PI3K qui régule la quantité du phosphoinositide $PI(3,4,5)P_3$ (PIP3) en fonction de la quantité de $PI(4,5)P_2$ (PIP2) et de PTEN

(67). A travers cette voie de signalisation, cette opsine entraîne l'activation de Rac1 (Figure 1-29 c).

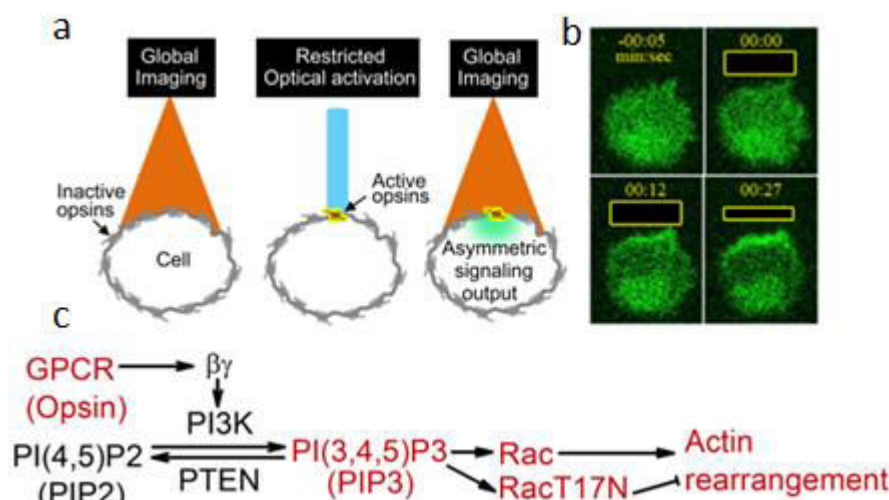


Figure 1-29: Contrôle de la migration cellulaire par activation d'opsines. (a) Principe de l'expérience : la cellule est observée en entier et de la lumière est envoyée localement pour activer localement les opsines. (b) Observation du signal fluorescent de Akt-Ph-GFP, un effecteur de PIP3. (c) Schéma résumé des voies d'interactions impliquant le système optogénétique ainsi que PI3K, PIP3 et Rac1. Figure adaptée de (67).

A partir de cette activation, des enrichissements en toutes les différentes protéines du réseau de signalisation, jusqu'à la polymérisation d'actine, sont observés. De plus, cette perturbation locale, maintenue au cours du temps, génère de la migration cellulaire.

Les chercheurs ayant réalisé ces expériences ont profité de la photosensibilité naturelle des opsines, cependant, toutes les voies de signalisation ne sont pas constituées de telles protéines. Pour contrôler l'activité d'une protéine qui ne possède aucune propriété d'interaction avec la lumière, il est possible, par exemple, de lui ajouter des éléments photosensibles qui bloquent son site catalytique en l'absence de lumière (68). Il a ainsi été publié en 2009 la création d'une protéine Rac1 photoactivable (PA-rac)(Figure 1-30, a).

En éclairant localement des cellules exprimant cette protéine, cela les active localement et crée des protrusions. En maintenant cette activité au cours du temps il a été observé que ce type de recrutement génère un mouvement global de la cellule (Figure 1-30, b, c).

Cette technique active, de manière directe et locale, des RhoGTPases dans les cellules, sans intervenir sur le réseau de signalisation en amont, ce qui peut améliorer notre compréhension de la manière dont l'organisation cellulaire se modifie au cours de la polarisation d'une cellule. Elle possède cependant deux inconvénients principaux : l'observation du nombre de protéines actives n'est pas possible et pour activer une autre RhoGTPase que Rac1, il faut entièrement repenser les propriétés biochimiques du domaine d'interaction avec la lumière.

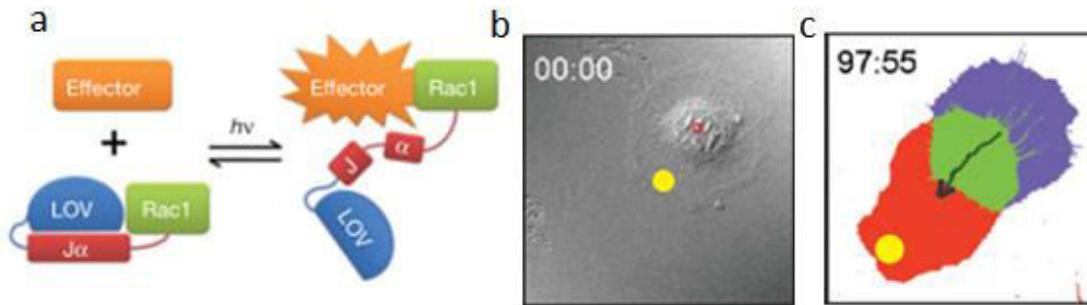


Figure 1-30 : Principe et action de PA-Rac. (a) Schéma de la protéine Rac1 photoactivable. En présence de lumière, le site actif de Rac1 devient accessible et interagit avec ses effecteurs. (b) Image DIC d'une cellule dans laquelle est activée Rac1 localement (point jaune). (c) En maintenant la perturbation locale et en la déplaçant pendant que la cellule se déplace, il est possible de déplacer globalement une cellule comme résumé par le détournement de son contour avant (bleu)/après (rouge). Figure adaptée de (68).

Recrutement local d'une protéine d'intérêt

Les limites liées aux systèmes opsine et PA-rac sont contournables par l'utilisation de la deuxième approche présentée sur la Figure 1-26 : recruter une protéine d'intérêt pour activer les RhoGTPases. Il existe désormais quatre systèmes différents fonctionnant sur cette base, tous forçant une protéine, initialement dans le cytoplasme, à se localiser au niveau d'une structure précise de la cellule, le plus souvent la membrane plasmique (Figure 1-31 et Figure 1-32). Cette approche est intéressante car, en ajoutant à cette protéine un fluorophore, nous pouvons en observer le changement de localisation et en quantifier le nombre.

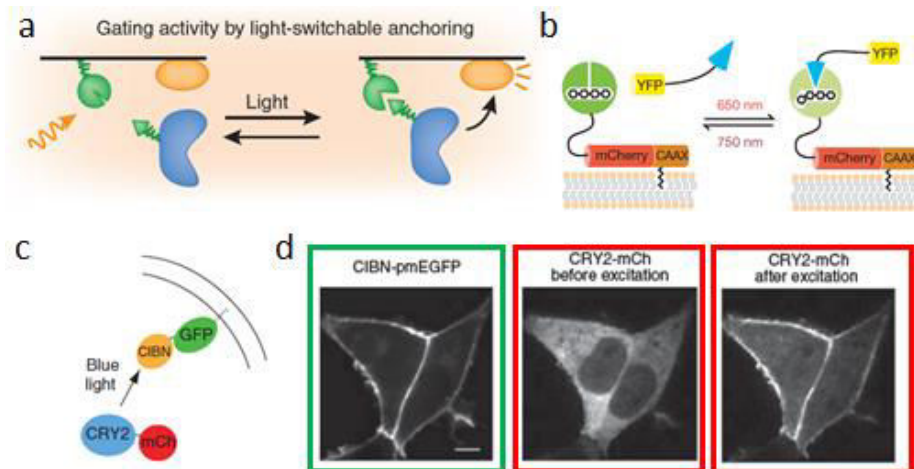


Figure 1-31 : Systèmes optogénétiques pour recruter une protéine d'intérêt. (a) Principe de recrutement optogénétique, adapté de (66). (b) Schéma du système PhyB/PIF6, adapté de (69). (c, d) Images adaptées de (70). (c) Schéma du système CRY2/CIBN. (d) Images de fluorescence du signal GFP lié à CIBN (gauche), au signal mCherry lié à CRY2 avant activation (au milieu) et après illumination globale avec de la lumière bleue (à droite). Barre d'échelle : 5 μ m.

Le premier système, PhyB/PIF6, publié en 2009 (Figure 1-31, b)(69) est constitué de la protéine Phytochrome B (PhyB) et de PIF6. Lorsque PhyB, dont la sensibilité à la lumière est activée par l'ajout d'une petite molécule (PCB), est illuminée par de la lumière à 650 nm, elle

change de conformation et se lie aux protéines PIF6 qui diffusent à proximité. PIF6 et les protéines qui y sont attachées sont donc recrutées là où PhyB est activée. Il est possible, par ailleurs, de forcer la dissociation des complexes PhyB/PIF6 créés en envoyant de la lumière de longueur d'onde 750 nm.

En 2010 a été publié un autre système, CRY2/CIBN (Figure 1-31, c)(70), constitué de deux protéines encodées génétiquement : CRY2-mCherry et CIBN-GFP. CRY2 est une protéine de type cryptochrome qui a la particularité de changer de conformation lorsqu'elle est illuminée par de la lumière bleue. A la protéine CIBN-GFP a été couplée une molécule hydrophobe forçant sa localisation à la membrane (Figure 1-31, d, gauche). Lorsqu'une cellule exprimant ces deux protéines est éclairée par de la lumière à 488 nm, les CRY2-mCherry cytoplasmiques changent de conformation et se fixent aux CIBN à la membrane (Figure 1-31, d, milieu, droite). Ce système reste stable pendant une durée caractéristique de l'ordre de 3 minutes puis se dissocie. Contrairement au système PhyB/PIF6, ce système ne nécessite pas l'ajout d'un troisième composant pour être actif.

Le troisième système, TULIPs, publié en 2012 (71) fonctionne sur le même principe que le précédent. La protéine photosensible LOVp est localisée à la membrane et la protéine ePDZ est initialement dans le cytoplasme. Lorsque LOVp est éclairée par un rayonnement de longueur d'onde inférieure à 500 nm, elle interagit avec ePDZ. Le type d'interaction généré n'est pas identique au système précédent. Dans ce cas, les deux protéines interagissent de manière dynamique avec un taux d'association et de dissociation, le recrutement final étant un équilibre entre ces deux processus. Différents mutants de ces protéines ont été caractérisés permettant de changer ces constantes cinétiques et choisir le couple le plus adapté à la dynamique de la question biologique adressée (Figure 1-32, a).

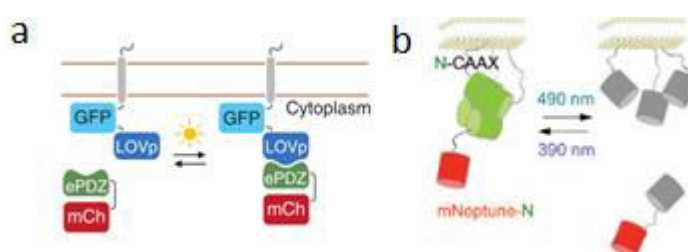


Figure 1-32 : (a) Schéma du système TULIPs adapté de (71) et du système Dronpa (b) adapté de (72)

Le dernier système optogénétique à avoir été publié se base sur l'utilisation de la protéine fluorescente Dronpa (72). Cette protéine forme un quadrimère lorsqu'elle est éclairée avec de la lumière à 390 nm qui se dissocie lorsqu'il est éclairé à 490 nm. En exprimant en parallèle des monomères de cette protéine à la membrane et ce même monomère fusionné à une protéine d'intérêt dans le cytoplasme, il est possible de recruter cette protéine à la membrane (Figure 1-32, b).

Ces différents systèmes possèdent chacun leurs spécificités mais semblent tous être efficaces pour recruter une protéine cytoplasmique à la membrane. En pratique, tous ne sont pas évident d'utilisation et nous spécifierons les raisons qui nous ont poussé à utiliser le système CRY2/CIBN.

Contrôle local de réseaux de signalisation

Ces systèmes, en particulier PhytB/PIF6, ont déjà été utilisés pour contrôler différents réseaux de signalisation, et permis par exemple d'activer les RhoGTPases Cdc42 et Rac1, en recrutant localement les domaines DHPH de leurs GEF respectives (Figure 1-33)(32).

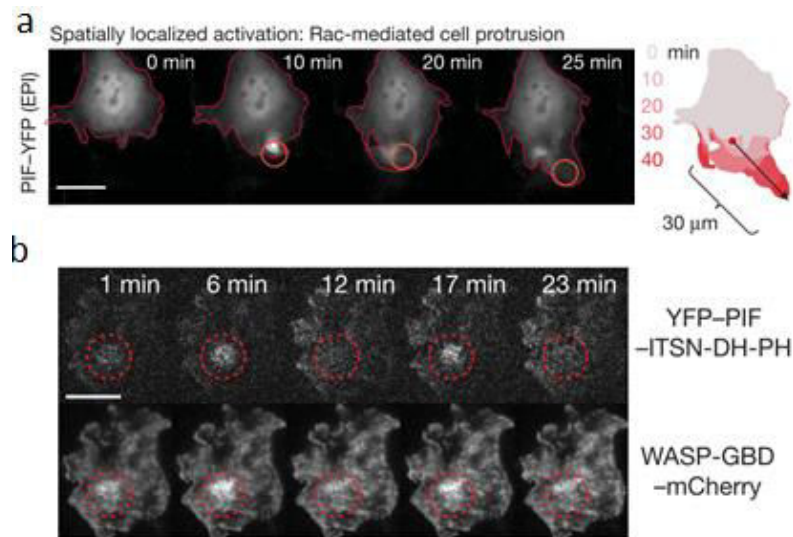


Figure 1-33 : Preuve de principe de l'activation locale de Rac1 et Cdc42. Figure adaptée de (69). (a) Recrutement local de Tiam1 et quantification de la création d'une protrusion de membrane. (b) Recrutement local de ITSN et quantification d'un effecteur de Cdc42 : le domaine d'interaction de WASP. Barres d'échelle : 20 μ m.

Dans le cas du recrutement local de Tiam1 (73) et de l'activation de Rac1, les auteurs ont rapporté avoir réussi à former une protrusion de membrane. Cette perturbation locale ne semblait pas induire de modification globale de la polarité de la cellule. De plus, ils ont démontré que le recrutement local de ITSN (74) recrute à cette même localisation un des effecteurs de Cdc42, ce qui confirme que Cdc42 est activé localement.

Depuis, l'utilisation de PhyB/PIF6 a été complétée par un contrôle précis de la quantité de protéines recrutées, grâce à l'observation du signal fluorescent de PIF6-YFP. Il est possible de contrôler cette quantité au cours du temps et de la faire suivre un patron défini à l'aide de boucle de rétroaction et d'un contrôle dynamique de la quantité de lumière envoyée (75). Pour aller plus loin, les auteurs de cet article ont même mis sous contrôle de la boucle de rétroaction la quantité de PIP3, un effecteur de la voie de signalisation impliquant PI3K (Figure 1-34).

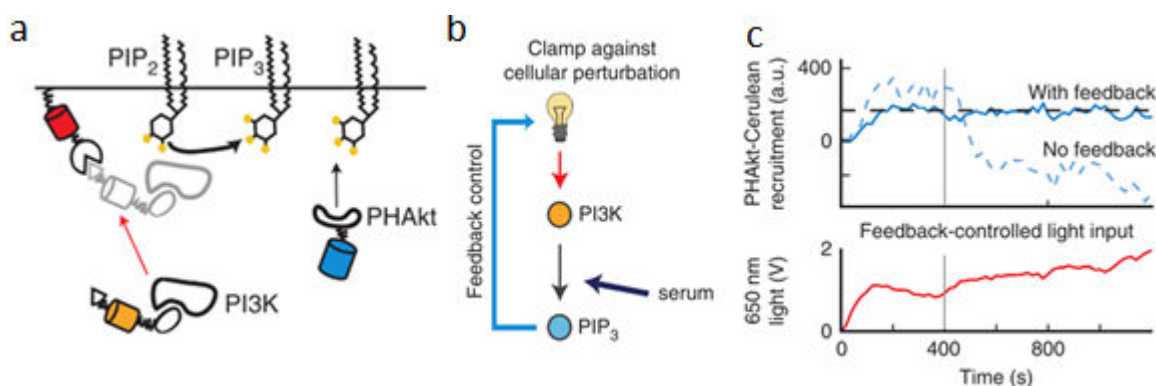


Figure 1-34 Principe du contrôle du niveau d'un effecteur par boucle de rétroaction. (a) Schéma du système PhyB/PIF6 associé au recrutement de PI3K et à l'observation de la quantité de PIP₃. (b) Principe de la boucle de rétroaction sur la quantité de PIP₃ à partir du contrôle de l'illumination. (c) Evolution temporelle de PIP₃ au cours du temps avec l'ajout de sérum au temps 400 secondes. En l'absence (pointillé bleu) et en présence (trait plein bleu) de rétroaction, la réponse n'est pas la même. Trait plein rouge, signal lumineux nécessaire à la rétroaction. Images adaptées de (75).

En observant, au cours du temps, l'évolution de la quantité de PIP₃, il est possible de modifier l'illumination afin de conserver cette quantité constante. De cette manière, il est même possible de conserver ce niveau constant dans des cellules NIH/3T3, malgré des changements de l'environnement comme lors de l'ajout de sérum dans le milieu de culture par exemple.

Depuis, le système CRY2/CIBN a également été utilisé pour contrôler l'activité locale d'un réseau de signalisation (76), comme dans le cas de la localisation d'une 5-phosphatase dans des cellules COS-7, entraînant la déphosphorylation de PIP₂ et de PIP₃ et ce de manière réversible. De plus, ce système peut mettre l'expression de gènes sous le contrôle de la lumière (77) et forcer la localisation cytoplasmique de protéines initialement membranaires (78).

Chapitre 2 Système optogénétique CRY2/CIBN

La polarité cellulaire est définie par une asymétrie quant à la localisation ou l'activité de protéines comme dans le cas des RhoGTPases sur l'exemple de la migration cellulaire. L'étape suivante, après l'observation de l'activité de celles-ci, pour mieux comprendre leur implication, est le contrôle spatiotemporel de leurs profils d'activité. De plus, pour que les informations obtenues soient les plus pertinentes possibles, il faut créer des perturbations similaires à celles endogènes, c'est-à-dire, activer les RhoGTPases à l'échelle subcellulaire (de l'ordre de quelques micromètres) et de manière réversible (de l'ordre de la minute).

Dans ce chapitre, nous allons présenter la prise en main du système optogénétique CRY2/CIBN (70). Nous verrons tout d'abord les raisons du choix de ce système optogénétique ainsi que le dispositif de microscopie nécessaire à son utilisation. Nous aborderons ensuite les caractéristiques biophysiques des trois principaux processus associés à la distribution membranaire de CRY2 après activation : son recrutement, la diffusion membranaire et la dissociation du complexe. Cette caractérisation est indispensable pour comprendre les limites de ce système, relatives à la taille minimale des perturbations et à la quantité de protéines recrutées en fonction des paramètres d'illumination. A la suite de cela, nous vérifierons expérimentalement que la distribution membranaire de CRY2 (niveau et étendue spatiale) est contrôlable précisément.

L'étude des paramètres de ce système valide la possibilité de l'utiliser dans le contexte des contraintes spatiotemporelles inhérentes à l'étude de la polarité pendant la migration cellulaire.

2.1 Dispositif expérimental d'optogénétique

2.1.1 Système biologique

Comme nous l'avons vu en introduction (Figure 1-31 et Figure 1-32), quatre systèmes optogénétiques principaux ont été développés au cours des cinq dernières années. Au début de cette thèse seuls deux existaient : le système PhyB/PIF6 (69) et le système CRY2/CIBN (70). Nous avons testé ces deux systèmes et comparé certaines de leurs caractéristiques.

Choix du système optogénétique

En théorie, le système PhyB/PIF6 (69) semble être parfait, malgré qu'il faille ajouter dans le milieu de culture la molécule PCB. En effet, puisque les étapes d'association et de dissociation sont contrôlées par la lumière, il doit être possible de créer des localisations membranaires de PhyB précises spatialement et temporellement. Dans les faits, ce système n'est pas évident d'utilisation pour une raison biologique importante : il est très mal exprimé par les cellules. Jared Toettcher, un des auteurs de l'article (69), nous a depuis confirmé que ces deux plasmides sont difficiles à transfecter et qu'il vaut mieux les infecter dans les cellules. De plus, il nous a indiqué que le ratio entre le nombre de protéines membranaires et le nombre de protéines cytoplasmiques doit être calibré précisément car il joue un rôle très important quant à la bonne capacité de PIF6 à être recruté à la membrane.

Nous avons, en parallèle, testé l'expression des plasmides du système CRY2/CIBN transfectés dans des cellules HeLa. Elle s'est avérée être meilleure, ce qui nous a poussé initialement à regarder ses caractéristiques expérimentales. Cependant, à la différence de PhyB/PIF6, ce système possède deux éléments dont il faudra tenir compte par la suite : la protéine photosensible CRY2 est cytoplasmique et la dissociation du complexe CRY2/CIBN ne peut pas être forcée avec de la lumière.

Depuis, nous avons aussi testé le système TULIPs (71), sans réussir à utiliser.

Lignée et condition de culture cellulaire

Tout au long de cette thèse - sauf si précisé - , les cellules que nous observons sont des cellules HeLa étalées sur des lamelles de verre, préalablement traitées avec une protéine de la matrice extra cellulaire (fibronectine) pour adhérer. Afin d'être dans les conditions les plus physiologiques possibles, la chambre de microscopie est chauffée à 37°C et baigne dans une atmosphère humide contenant 5 pourcent de dioxyde de carbone (Figure 2-1).

Les films que nous effectuons sur ces cellules sont réalisés en microscopie plein champ, en transmission avec de la lumière blanche ou bien en microscopie inversée avec de la fluorescence. Du fait de la taille caractéristique des cellules HeLa, de l'ordre de la cinquantaine

de micromètres, nous avons principalement utilisé des objectifs 60X qui, associés à la caméra, génèrent un champ de vue de l'ordre d'une centaine de micromètres de côté ce qui permet de visualiser les cellules en entier.

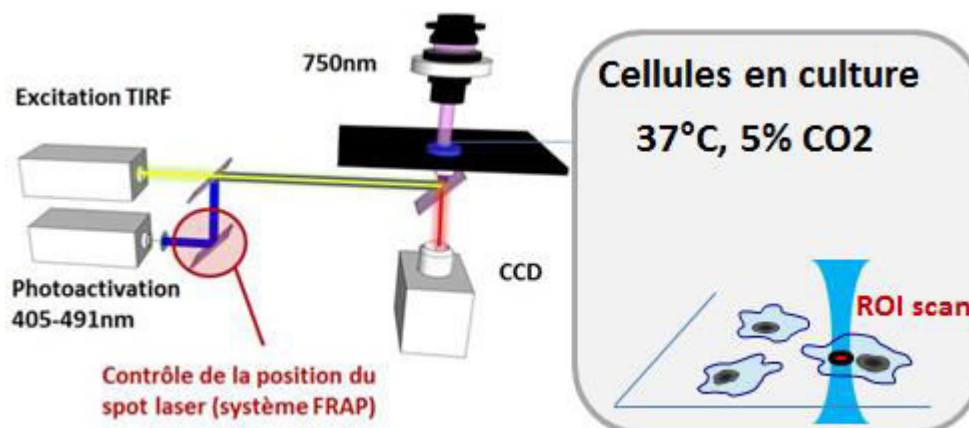


Figure 2-1 : Présentation du dispositif de microscopie utilisé. Gauche : l'imagerie en TIRF et la photoactivation sont couplés pour illuminer l'échantillon. Un filtre infra-rouge est placé devant la lumière blanche pour ne pas photoactiver globalement les cellules. Droite : pour rester dans les conditions biologiques, la température et la teneur en CO₂ de l'échantillon sont contrôlées.

2.1.2 Dispositif de microscopie

Avec l'optogénétique, nous espérons créer des recrutements subcellulaires de protéines à la membrane des cellules et les quantifier. Pour ce faire, le microscope doit posséder les caractéristiques suivantes : il doit permettre d'envoyer de la lumière localement dans les cellules et quantifier en même temps le recrutement membranaire de la protéine d'intérêt. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé au laboratoire un dispositif de microscopie couplant une observation TIRF avec un module de FRAP.

Les expériences présentées dans cette thèse ont été effectuées sur un microscope Olympus IX-71, doté d'objectifs 60X et 100X ayant une grande ouverture numérique (1.43 et 1.45 respectivement) conçus pour faire de la microscopie de fluorescence par réflexion totale - Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy (TIRFm). Le principe de ce type de microscopie se base sur un microscope inversé de fluorescence. Des fluorophores sont excités par de la lumière incidente dont la longueur d'onde a été sélectionnée. Les protéines fluorescentes en se désexcitant émettent des photons de manière isotrope et la fluorescence est collectée sur la caméra pour former l'image de fluorescence. Le TIRF consiste en l'envoi de la lumière d'excitation des fluorophores avec un angle par rapport à l'axe de la lamelle, lumière dont une partie est transmise et l'autre réfléchi. Lorsque cet angle devient supérieur à l'angle de réflexion totale pour une transition verre – eau, le faisceau lumineux est totalement réfléchi. Cependant, une onde évanescente se propage au-delà de la lamelle sur une distance dépendant

de l'angle d'incidence et de la longueur d'onde, cette onde possédant suffisamment d'énergie pour activer les fluorophores proches de la lamelle.

L'intérêt de ce type de microscopie est sa résolution axiale. En effet, seules les protéines fluorescentes présentes dans une couche de 50 à 200 nm de distance par rapport à la lamelle vont être excitées, ce qui limite le bruit lié aux molécules cytoplasmiques au-delà de cette distance. De plus, cela limite le photoblanchiment global de la cellule. Lorsque nous comparons l'image d'une cellule observée en microscopie inversée conventionnelle et l'image de cette même cellule en microscopie TIRF, nous observons des détails membranaires dans le second cas (Figure 2-2, b) invisibles dans le premier (Figure 2-2, a) comme un recrutement asymétrique de protéine sur la moitié de la cellule.

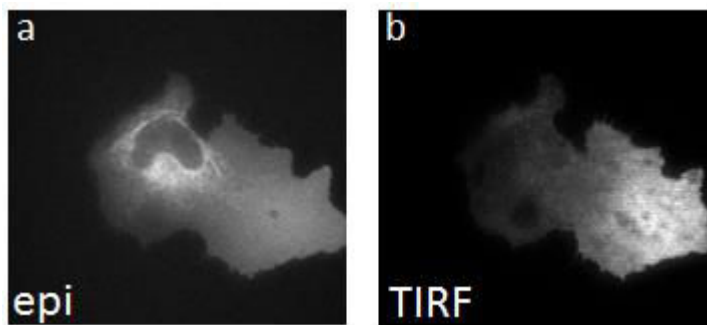


Figure 2-2 : Cellule HeLa transfectée avec une protéine dont la localisation est cytoplasmique et membranaire. (a) Image en épifluorescence du signal mCherry. (b) Signal TIRF de la même fluorescence. Nous observons sur (b) qu'il y a une répartition non homogène de cette molécule à la membrane, moins visible sur l'image (a).

Il a été publié (70) que pour générer le changement de conformation de la protéine CRY2, et sa localisation à la membrane, il faut envoyer de la lumière bleue. L'observation d'un signal GFP utilisant un laser d'excitation à 491 nm permet de créer ce recrutement membranaire. Cependant, nous souhaitons créer des localisations asymétriques de CRY2, il faut donc envoyer de la lumière localement sur la lamelle. Dans ce but, nous avons décidé d'utiliser un module plus généralement utilisé pour faire des expériences de retour de fluorescence après photoblanchiment – *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP). Le système commercial dont nous disposons focalise un faisceau laser dans le plan focal objet de l'objectif, ce qui crée une localisation de lumière à 491 nm avec une résolution spatiale, dans ce plan, de l'ordre de la longueur d'onde - limitée par la diffraction. Pour illuminer des régions de taille supérieure, il suffit alors de scanner avec ce spot focalisé la région souhaitée.

La durée des expériences présentées dans cette thèse est comprise entre une trentaine de minutes à 3 heures, ce qui implique, pour avoir une statistique importante quant à la réponse des cellules, en activer plusieurs en parallèle. Cela a été possible par l'ajout sur le microscope d'une platine motorisée ainsi que d'un actionneur piezo-électrique d'objectif pour contrôler respectivement la position XY de la platine et la hauteur Z de l'objectif. De cette manière, il est

possible d'enregistrer la position de une à trente cellules (selon la fréquence des images et le nombre de canaux de fluorescence utilisés) qui sont soumises en parallèle aux mêmes caractéristiques d'imagerie et d'illumination toute au long de l'expérience.

Le système TIRF/FRAP utilisé dans cette thèse n'est pas l'unique système utilisable pour répondre aux contraintes du système optogénétique. Un microscope confocal à balayage laser ou un microscope confocal à disque rotatif avec un module FRAP permettraient de faire la même chose. Cependant, ce système possède l'avantage d'être plus rapide que le premier et de moins photoblanchir les échantillons que ces deux autres systèmes.

2.2 Dynamique de CRY2-mCherry à la membrane

Le premier point à vérifier est que nous sommes capables de créer et de quantifier avec ce dispositif de microscopie un recrutement de CRY2-mcherry à la membrane des cellules HeLa en envoyant de la lumière à 491 nm, comme il a été publié dans (70).

2.2.1 Recrutement global et diffusion cytoplasmique

Les cellules étudiées, préalablement transfectées avec les plasmides CRY2-mCherry et CIBN-GFP, expriment correctement ces protéines respectivement dans le cytoplasme et à la membrane. Cependant, lors des premières expériences où elles ont été illuminées par de la lumière bleue, nous n'avons pas observé d'augmentation du signal TIRF de fluorescence à la membrane. Cela s'explique par l'utilisation d'une puissance lumineuse trop importante pour l'observation de la protéine CRY2-mCherry et donc un photoblanchiment trop important. Après une optimisation des intensités lasers et des temps d'exposition utilisés afin de limiter ce phénomène, nous avons observé les premiers recrutements de CRY2 à la membrane. Ainsi, un pulse de lumière bleue (100 ms, 9 μ W @491 nm) entraîne une augmentation, en 5 secondes, du signal de fluorescence mCherry de l'ordre de 20 pourcent de son niveau basal.

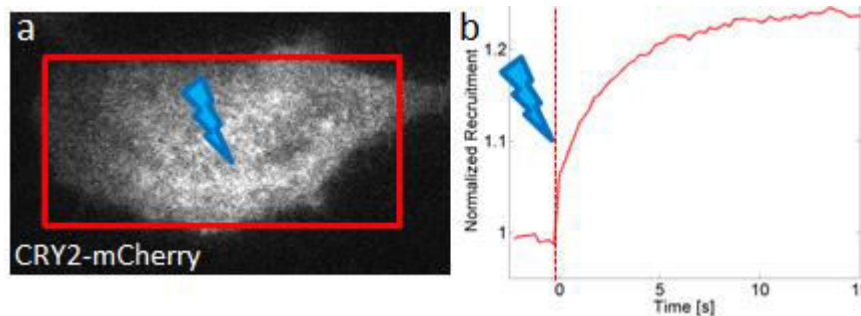


Figure 2-3 : Expérience de photoactivation globale. (a) Signal TIRF de CRY2-mCherry 5 secondes après avoir envoyé un pulse de lumière bleue dans toute la région rouge. (b) Quantification du signal TIRF au cours du temps normalisé par la moyenne des cinq premières images. Le pulse de lumière bleue a été envoyé juste avant $t = 0s$.

Ce signal, moyenné sur toute la région rouge, est une mesure directe de la quantité de protéines CRY2-mCherry à la membrane. En envoyant un pulse de lumière bleue, nous venons de changer la conformation d'une partie des protéines CRY2-mCherry dans le cytoplasme. Ces protéines, après avoir diffusé à trois dimensions dans le cytoplasme, se lient à des protéines CIBN-GFP à la membrane. En considérant que les cellules ont une hauteur caractéristique de l'ordre de $h \sim 5 \mu m$, que le coefficient de diffusion de CRY2-mCherry dans le cytoplasme est de l'ordre de $D \sim 1 \mu m^2/s$ et que seule la diffusion est à prendre en compte, nous nous attendons à trouver un temps caractéristique de l'ordre de $t = h^2/6D$. Le temps caractéristique de 4 secondes ainsi obtenu est cohérent avec la valeur expérimentale mesurée de 5 secondes. Cette expérience nous a montré que le système fonctionne au laboratoire et que l'étape initiale de recrutement est compatible avec un processus limité par la diffusion dans le cytoplasme.

Lors de ces expériences, nous avons déterminé que ces recrutements sont générés pour des longueurs d'ondes comprises entre 405 et 530 nm, en accord avec ce qui est connu de la photosensibilité des cryptochromes (79). Par ailleurs, il a été reporté que lorsque la protéine CRY2 est activée, elle forme des clusters avec ses homologues (80), ce que nous n'avons pas remarqué lors de nos expériences - probablement car son affinité pour CIBN est supérieure à celle pour les autres protéines CRY2.

2.2.2 Recrutement local, diffusion membranaire et dissociation

Cet outil optogénétique est destiné à l'étude de la polarité cellulaire, il doit donc permettre d'effectuer des recrutements subcellulaires de CRY2. Nous avons alors regardé l'effet de l'envoi de lumière bleue successivement dans deux régions subcellulaires d'une cellule cotransfectée avec CRY2 et CIBN (six pulses dans la région rouge, puis six dans la région vertes, Figure 2-4, a). Sans avoir besoin de quantifier les niveaux de fluorescence, il est clair que CRY2-mCherry est localisé ainsi à gauche puis à droite sur la membrane de cette cellule (Figure 2-4, b, c).

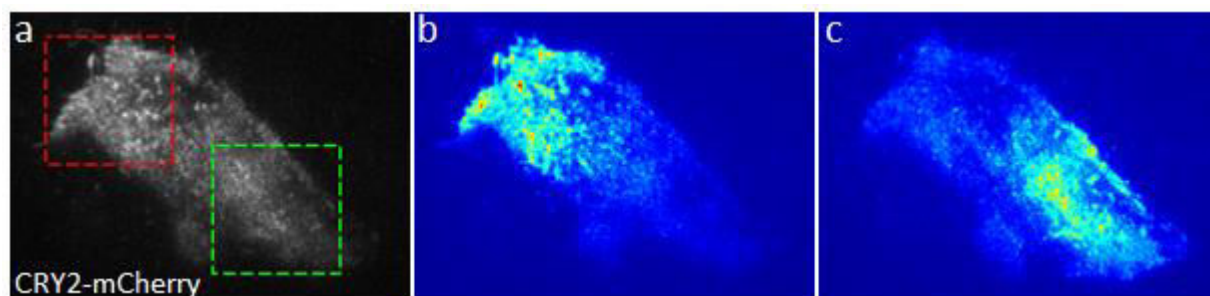


Figure 2-4 : Expérience de photoactivation locale. Cellule HeLa cotransfectée avec le système CRY2/CIBN. (a) Image TIRF de CRY2-mCherry. La première et la deuxième région de photoactivation sont représentées respectivement en rouge et en vert. (b-c) Images différentielles de la cellule entre avant et après les six premières (b) et les douze activations (c). Hauteur des images : 60 μm .

En quantifiant précisément ces recrutements (Figure 2-5), j'ai mis en évidence les trois phénomènes physiques importants du système. i) Dans la région rouge, après le premier pulse de lumière bleue, le signal TIRF augmente rapidement du fait du recrutement à la membrane de CRY2-mCherry. Lors des pulses suivants, le signal ré-augmente systématiquement. La quantification de la fluorescence dans la région verte - qui n'est pas soumise à de la lumière activatrice - ne montre aucun recrutement lors de ces six premiers pulses. ii) Cependant, j'ai observé que, sur les 800 premières secondes, ce signal augmente doucement. Cela s'explique par une diffusion à la membrane de complexes CRY2-CIBN formés dans la zone rouge. iii) Dès lors que nous arrêtons d'envoyer de la lumière bleue sur la région rouge, le signal de fluorescence diminue, du fait de la dissociation du complexe d'une part et de la diffusion à la membrane d'autre part. Lorsque la région verte est illuminée à son tour avec de la lumière bleue, CRY2-mCherry est recrutée dans cette région.

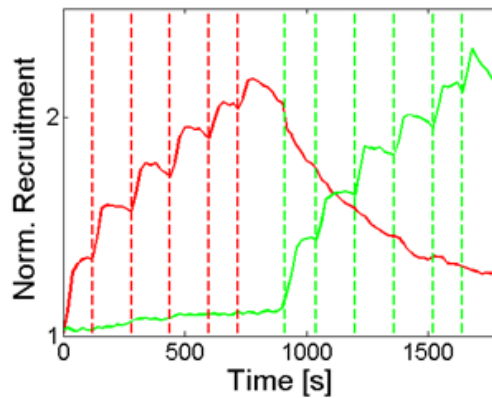


Figure 2-5 : Quantification au cours du temps du niveau de fluorescence TIRF (du film de la Figure 2-4) dans la région rouge (respectivement verte) normalisée par la valeur avant photoactivation. Chaque trait pointillé représente l'envoi de lumière activatrice dans la région correspondante.

Ces trois processus sont résumés sur Figure 2-6 où sont représentées : la diffusion à trois dimensions dans le cytoplasme, la diffusion à deux dimensions à la membrane et la dissociation du complexe.

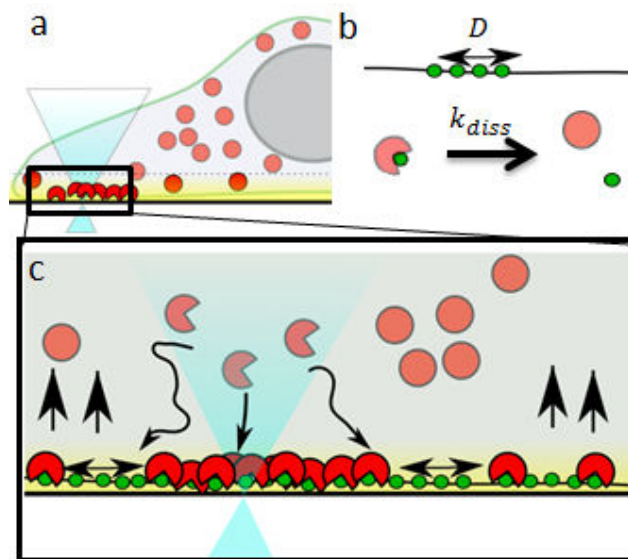


Figure 2-6 : Schéma résumé des différents phénomènes en jeu dans le système. (a) Schéma d'une cellule éclairée par un faisceau focalisé de lumière bleue. Rond rouge (respectivement "pacman" rouge), protéines CRY2 en conformation inactive (respectivement active). La zone de TIRF est définie par le halo jaune. Lorsqu'une protéine CRY2-mCherry entre dans cette région elle devient visible à la caméra (rouge chaud). (b) Présentation schématique des phénomènes de diffusion à deux dimensions et du phénomène de dissociation. (c) Zoom sur une région d'activation proche de la membrane où sont soulignés par des flèches noires les trois phénomènes en jeu.

Comme nous le verrons dans cette thèse, nous avons deux possibilités pour comparer ces résultats les uns par rapport aux autres. La première possibilité est de tracer le rapport du signal mesuré sur la moyenne du signal avant la première activation (Figure 2-3). En considérant que le signal initial est dû au bruit cytoplasmique de CRY2 - proportionnel à la concentration

cytoplasmique -, nous pouvons représenter ainsi le recrutement relativement à la concentration cytoplasmique. La deuxième possibilité pour représenter ces mesures est celle utilisée, par exemple, sur la Figure 2-8 et la Figure 2-12 où est soustrait à la valeur du signal la moyenne du signal avant la première activation. Dans ce cas, ce qui est représenté est davantage une mesure de la quantité de protéines recrutées en unité de fluorescence (en considérant que toute la fluorescence initiale est du bruit et non une interaction spécifique à la membrane). Nous avons utilisé dans cette thèse les deux représentations, la première pour mettre en valeur les recrutements, et la seconde lorsqu'il s'agissait d'obtenir des valeurs proportionnelles à la quantité de protéines recrutées à la membrane.

2.3 Détermination des caractéristiques biophysiques de CRY2/CIBN

Nous venons de montrer que CRY2 peut être recruté localement à la membrane. Le but de notre approche étant de contrôler spatialement et temporellement la localisation de protéine, il est nécessaire de quantifier précisément les trois processus en jeu pour appréhender les limites de ce type de recrutement subcellulaire.

2.3.1 Recrutement de CRY2 à la membrane

La première étape est celle du recrutement à la membrane après diffusion dans le cytoplasme. Nous avons étudié la distribution spatiale du recrutement en fonction des caractéristiques de l'illumination. Nous avons donc envoyé de la lumière, de manière reproductible, sur une région circulaire de 3 μm de diamètre en faisant varier les paramètres d'illumination. Nous avons alors analysé les images différentielles constituées de l'image 3 seconde après l'activation à laquelle est soustrait la moyenne des cinq images précédant l'activation (Figure 2-7, a). La première observation est que le signal obtenu est très bien approximé par une gaussienne à deux dimensions d'amplitude A et de largeur à mi-hauteur σ (Figure 2-8, a).

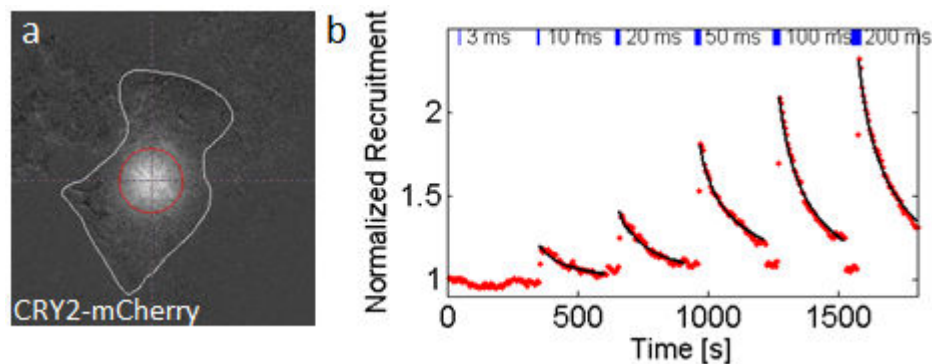


Figure 2-7 : Photoactivation ponctuelle du système CRY2/CIBN. (a) Image différentielle entre avant et après une photoactivation avec une région circulaire de 3 μm de diamètre. La largeur (15 μm) de la gaussienne obtenue est représentée en rouge. (b) Quantification au cours du temps de l'amplitude de la gaussienne pour une même cellule en faisant varier le temps d'exposition de 3 à 200 ms - en gardant la puissance laser constante (environ 5,5 μW).

Ce résultat s'explique par le fait que chaque protéine a une probabilité de se fixer à la membrane avec une distribution spatiale approximativement gaussienne - en considérant la membrane parfaitement absorbante. Le centre de cette gaussienne étant la projection de la position initiale de CRY2 sur la membrane, son amplitude et sa largeur étant fonction de la distance initiale à la membrane, le signal résultant de la diffusion de toutes les protéines CRY2 activées est donc la somme de ces distributions gaussiennes. Expérimentalement, cette somme

ressemble à une gaussienne. Nous avons ensuite calculé pour différentes illuminations sa largeur à mi-hauteur, son amplitude et l'aire sous la courbe.

Dans Figure 2-7, (b), et Figure 2-8, par exemple, nous modifions le temps d'exposition à puissance de laser fixée (pour une même cellule) et nous quantifions respectivement la quantité de fluorescence au cours du temps et la forme du profil gaussien.

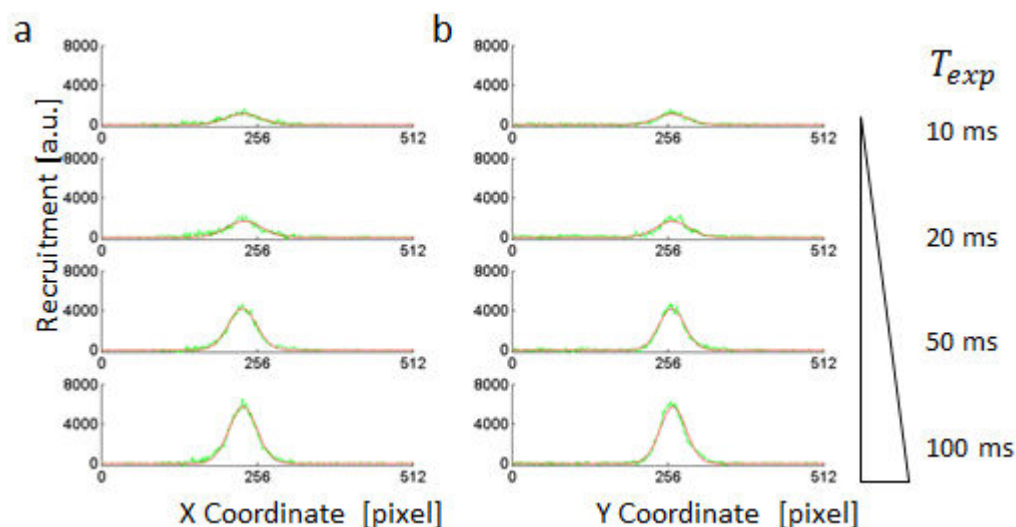


Figure 2-8 : Analyses à deux dimensions du profil de recrutement de CRY2. (vert) Signal différentiel TIRF obtenu après un pulse ponctuel de lumière bleue en faisant varier le temps d'exposition de 10 à 100 ms (puissance = 5,5 μ W) et quantifié selon deux directions (a) et (b) perpendiculaires. A ce signal est superposé le résultat de l'ajustement d'une gaussienne à deux dimensions (en rouge).

Nous remarquons sur ces figures que plus le pulse de lumière bleue est long, et plus le recrutement est important. Cependant, à partir de valeurs de temps d'exposition de l'ordre de 50 ms (pour une puissance d'environ 5,5 μ W), le recrutement juste après exposition n'augmente plus aussi rapidement que pour des temps d'exposition plus petits ou la progression semblait plutôt linéaire. Cela s'explique par le fait que le nombre de protéines CRY2 dans le volume activé est limitant. A partir d'un certain moment, la majorité des protéines dans la zone illuminée est activée et envoyer plus de lumière ne recrute pas davantage de CRY2. La compréhension de la dépendance de ce recrutement en fonction de la concentration initiale dans la cellule, du temps d'exposition et de la puissance du laser utilisés est donc un enjeu important pour contrôler le nombre de protéines recrutées à la membrane.

Nous avons regardé la dépendance du recrutement en fonction de la concentration dans la cellule. Théoriquement, si la probabilité pour un photon d'activer une molécule CRY2 est constante, et que le nombre de photons n'est pas limitant, alors le recrutement doit être proportionnel à la concentration dans une cellule. Expérimentalement, nous avons accès au signal TIRF mCherry et au signal d'épifluorescence (signal global de toutes les molécules présentes dans une cellule). D'après la Figure 2-9 (a), nous remarquons que, avant les

activations, ces deux signaux sont proportionnels. En considérant maintenant que le signal d'épifluorescence est proportionnel à la concentration de CRY2 dans la cellule, cela signifie que la lecture du niveau initial de fluorescence TIRF est proportionnelle à la concentration cellulaire.

En comparant le niveau des recrutements pour un pulse donné (à temps d'exposition et puissance laser fixés) sur vingt-six cellules exprimant des niveaux de CRY2-mCherry différents, nous avons vérifié que le recrutement est proportionnel à la concentration cytoplasmique - les points expérimentaux étant bien groupés autour d'une droite passant par 0 (Figure 2-9, b).

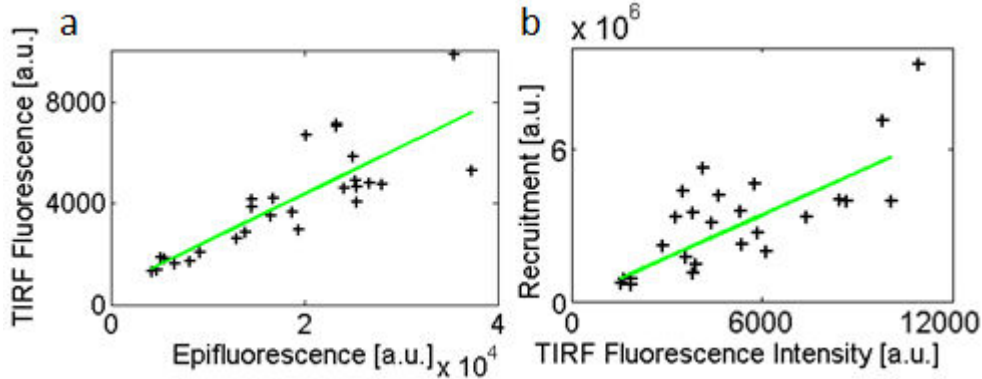


Figure 2-9 : Quantification de la relation entre recrutement et concentration initiale dans la cellule. (a) Signal TIRF en fonction du signal d'épifluorescence. En vert, ajustement linéaire. (b) Quantification du niveau de recrutement de CRY2 en fonction du niveau de fluorescence TIRF pour 26 cellules soumises à la même photoactivation ponctuelle.

Si N_s est la quantité de protéines recrutées par une seule activation, et que cette grandeur est proportionnelle à la concentration initiale C_0 dans la cellule, elle reste fonction des autres paramètres d'illumination comme la puissance laser P et le temps d'exposition T_{exp} .

$$N_s = C_0 * f(P, T_{exp})$$

Pour expliciter la fonction $f(P, T_{exp})$, nous avons effectué deux jeux d'expériences et tracé N_s/C_0 en fonction de P (respectivement T_{exp}), à T_{exp} fixé (respectivement P fixé). Ces expériences indiquent que la quantité totale de protéines recrutées - proportionnelle au produit de l'amplitude et de la largeur à mi-hauteur au carré - augmente progressivement lorsque P et T_{exp} augmentent jusqu'à atteindre un régime où l'évolution semble saturer (Figure 2-7, a) et (Figure 2-10, c).

A partir de ces expériences, nous avons déterminé $E_{1/2}$, qui correspond à la valeur du produit entre P et T_{exp} pour effectuer un recrutement de CRY2 de la moitié de la valeur maximale recrutée. N_s se réécrit alors sous la forme :

$$N_s = g(V) * C_0 * \frac{PT}{E_{1/2} + PT}. \quad (2.1)$$

Les déterminations de $E_{1/2}$ pour T_{exp} fixé et pour P fixé donnent des résultats comparables de l'ordre de $2,5 \cdot 10^{-7} J$.

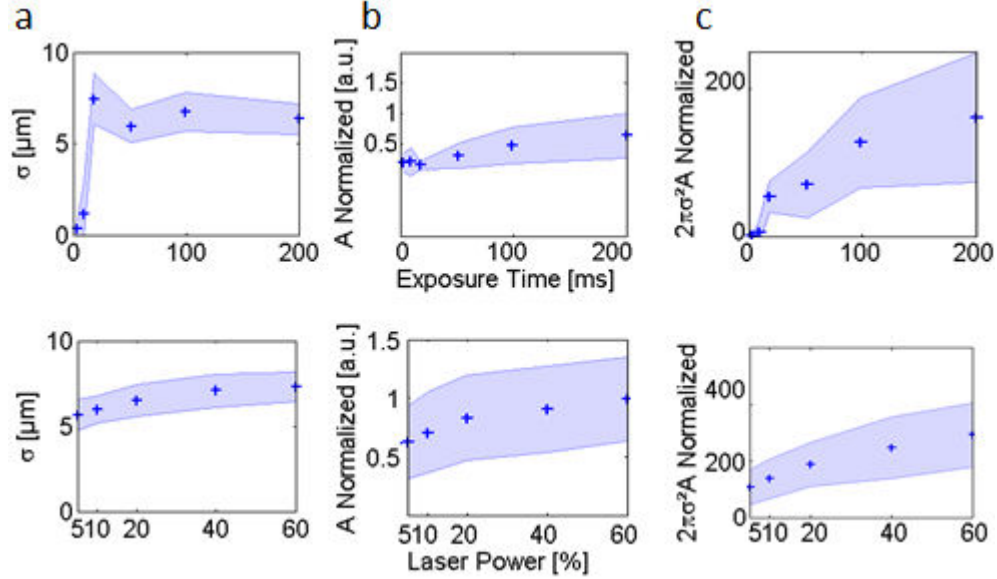


Figure 2-10 : Evolution du recrutement en fonction du temps d'exposition et de la puissance laser. (a-c) Résultat des ajustements gaussiens concernant la largeur à mi-hauteur σ (a), l'amplitude A (b), et l'intégrale de l'aire sous la gaussienne (c) pour une puissance laser fixée à $5,5 \mu W$ (haut) et un temps d'exposition variant de 5 à 60 ms ou un temps d'exposition fixé à 50 ms (bas) la puissance variant de $5 \mu W$ (5%) à $36 \mu W$ (60%). Zone bleue transparente : écart type associé aux 26 courbes

2.3.2 Diffusion membranaire de CIBN et du complexe CRY2/CIBN

Le deuxième processus à étudier est la diffusion membranaire de la protéine CIBN-GFP ancrée à la membrane. En effet, la diffusion de cette protéine modifie au cours du temps la localisation initiale de CRY2-mCherry. Nous avons obtenu le coefficient de diffusion qui caractérise cette diffusion par des expériences de FRAP sur la GFP associée à cette protéine (81). Le principe de ces expériences est de photoblanchir quasi instantanément la fluorescence dans une région membranaire donnée et de quantifier le retour de la fluorescence par diffusion des protéines voisines – et par le départ des protéines photoblanchies. Ce phénomène est régi par une équation de diffusion à deux dimensions de la forme suivante :

$$\frac{\partial N}{\partial t} - D_{2D} \Delta N = 0, \quad (2.2)$$

où N représente le nombre de protéines fluorescentes au cours du temps et D_{2D} le coefficient de diffusion de CIBN. Dans un système de coordonnées polaires, centré sur le centre de la région de FRAP, les conditions aux limites concernant N s'écrivent :

- $N(r, t = 0^+) = 0$ pour $r < a$,
- $N(r, t = 0^+) = 1$ sinon.

Avec a le rayon de la zone photoblanchie. En pratique, le signal le plus évident à mesurer est le signal moyen de fluorescence dans la région de FRAP. Nous tracerons alors :

$$\int_0^{+a} N(r, t) 2\pi r dr.$$

En ajustant sur ces données la solution théorique de ce problème (82) :

$$e^{-\frac{a^2}{2D_2Dt}} \left(I_0 \left(\frac{a^2}{2D_2Dt} \right) + I_1 \left(\frac{a^2}{2D_2Dt} \right) \right),$$

avec I_0 et I_1 les fonctions de Bessel modifiées d'ordre 0 et d'ordre 1, nous avons accès à la valeur de D_{2D} .

J'ai effectué ces expériences sur des cellules transfectées avec CIBN-GFP et obtenu $D = 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (+/- $0,03 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $N=26$). Par ailleurs, ces mêmes expériences de FRAP, réalisées sur les complexes CRY2/CIBN, ne montrent pas de différences significatives quant à la valeur du coefficient obtenu- les complexes étant créés par une illumination globale des cellules avant la routine de FRAP. Cela s'explique par le fait que le comportement diffusif du complexe CIBN-GFP/CRY2-mCherry est dominé par l'effet de l'ancre membranaire associée à CIBN-GFP et non pas par la diffusion de CIBN/CRY2 dans le cytoplasme à proximité de la membrane.

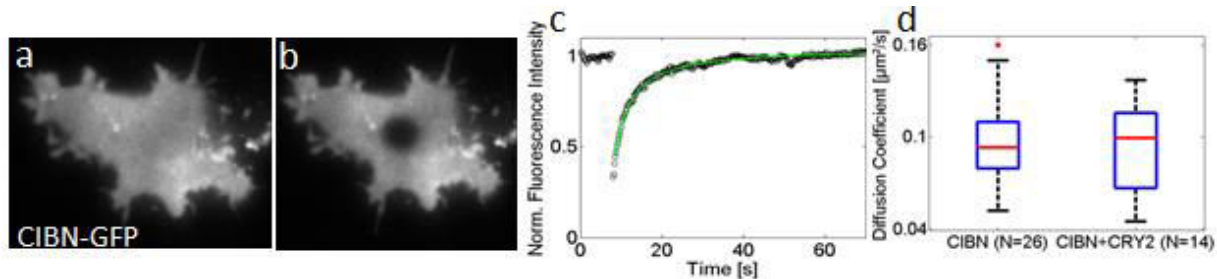


Figure 2-11 : Analyse des expériences de FRAP et détermination des coefficients de diffusion. (a-b) Image de fluorescence de CIBN-GFP en TIRF avant (a) et après (b) l'étape de photoblanchiment. (c) En noir, courbe du signal TIRF dans la région de photoblanchiment au cours du temps, normalisée par la moyenne des points avant le photoblanchiment. En vert, ajustement avec le modèle de retour de fluorescence. (d) Quantification des coefficients de diffusion de CIBN-GFP seul ($N=26$) ainsi que du complexe CIBN-GFP/CRY2-mCherry ($N=14$)

2.3.3 Dissociation du complexe CRY2/CIBN

Le dernier processus physique à caractériser est le temps de vie du complexe CRY2/CIBN après activation. En considérant un modèle de dissociation pour CRY2 à la membrane (C_m) dépendant uniquement d'un taux de dissociation k_{diss} , nous pouvons écrire :

$$\frac{d C_m}{dt} = -k_{diss} C_m \quad (2.3)$$

L'évolution temporelle de C_m , après une activation, doit donc être de la forme :

$$C_m \propto e^{-k_{diss}(t-t_0)}$$

Pour évaluer k_{diss} , nous avons quantifié l'évolution temporelle de recrutements de CRY2-mCherry (Figure 2-12). De plus, pour éliminer les effets dus à la diffusion, nous avons recruté CRY2 de manière homogène à la membrane.

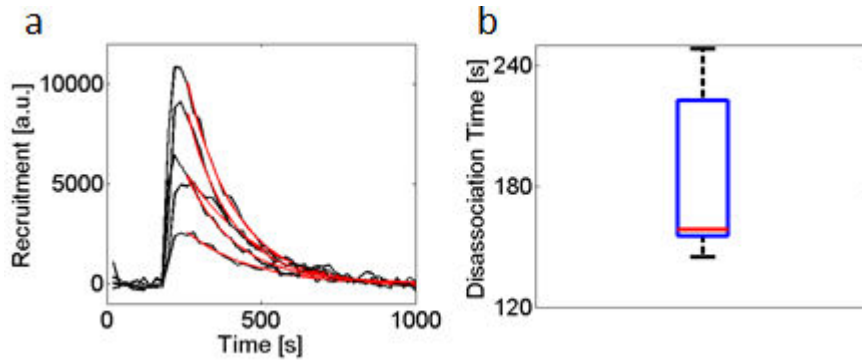


Figure 2-12 : Détermination du taux de dissociation du complexe CRY2/CIBN. (a) En noir, quantification de la valeur moyenne du signal TIRF de cinq cellules au cours du temps à laquelle a été retiré la valeur moyenne avant activation. En rouge, ajustement exponentiellement décroissant des courbes expérimentales. (b) Répartition des valeurs obtenues à partir des ajustements.

L'ajustement de ces courbes expérimentales par une exponentielle décroissante est en accord avec un modèle à une étape (Eq. (2.3)). Le temps caractéristique de dissociation obtenu est de $\tau_{diss} = 1/k_{diss} = 180 \text{ s} \pm 40 \text{ s}$, en accord avec les valeurs déjà publiées (70)(76).

D'après ce que nous venons de voir, la localisation de CRY2-mCherry est bien modélisée par la somme des équations (2.2) et (2.3) avec un terme supplémentaire $S(x, y, t)$:

$$\frac{d C_m(x, y, t)}{dt} = -k_{diss} C_m(x, y, t) + D_{2D} \frac{\partial^2 C_m(x, y, t)}{\partial x^2} + S(x, y, t), \quad (2.4)$$

cette équation tenant compte de la dissociation du complexe (k_{diss}), la diffusion à la membrane (D_{2D}) ainsi que d'un terme source $S(x, y, t)$ relatif aux caractéristiques spatiotemporelles de l'illumination et de la cellule.

2.4 Dynamique du recrutement et état stationnaire

Les trois processus que nous venons de décrire expliquent correctement un recrutement transitoire de CRY2-mCherry à la membrane. Nous nous sommes intéressés, ensuite, à la réponse de ce système optogénétique à une illumination maintenue au cours du temps. Cette réponse nous indiquant les possibilités de ce système quant aux distributions spatiales de CRY2 que nous pouvons créer.

2.4.1 Dynamique du recrutement

A chaque fois qu'une région d'intérêt est illuminée avec de la lumière bleue, la quantité totale de CRY2-mCherry recruté augmente (Figure 2-4). Or, pour ces protéines, les cellules sont des systèmes fermés, et sur des échelles de temps de l'ordre de 2 heures, la production de CRY2-mCherry est nulle, ce qui signifie que la quantité totale est constante. Ces deux éléments indiquent qu'en maintenant une illumination périodique locale, nous devrions créer un recrutement permanent dans les cellules.

Expérimentalement, une activation locale, de période 40s, maintenue pendant 10 minutes, génère un recrutement stationnaire stable à partir de quatre pulses de lumière (Figure 2-13, courbe verte). En parallèle, la fluorescence dans la zone rouge diminue, ce qui indique que la concentration cytoplasmique de CRY2-mCherry diminue.

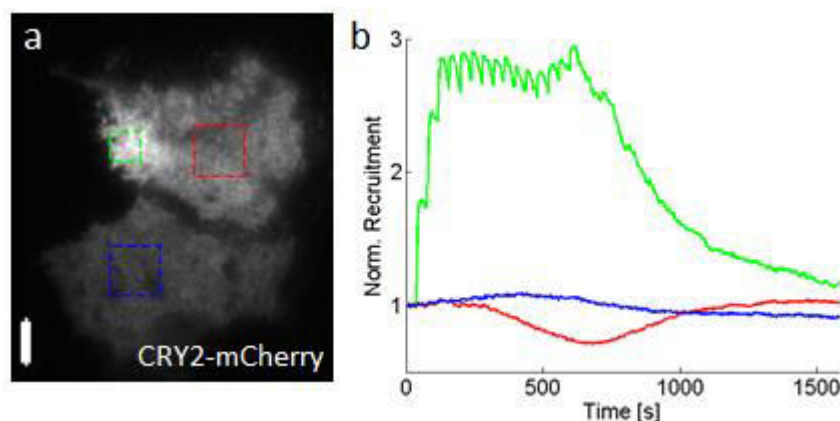


Figure 2-13 : Recrutement local de CRY2-mCherry et obtention d'un état stationnaire. (a) image TIRF du signal CRY2-mCherry après 250 secondes d'activation périodiques ($T=40s$). Région verte, région d'activation, région rouge, autre région de la même cellule, région bleue, région contrôle sur une cellule voisine. Barre d'échelle : 10 μm . (b) Quantification de la fluorescence moyenne dans les différentes régions normalisée par leur valeur avant l'activation.

L'explication de cet état stationnaire est la suivante : lors des premiers recrutements, il y a une grande quantité de protéines à activer dans le cytoplasme, d'où les grands sauts de fluorescence au moment des activations. Le cytoplasme est progressivement déplété en CRY2-mCherry, jusqu'au moment où la quantité de protéines qui est recrutée par un pulse de lumière

bleue est égale à la quantité de protéine qui disparaît de la région d'intérêt - soit par diffusion à la membrane, soit par dissociation. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons réalisé des simulations numériques en discrétisant l'équation (2.4). Le terme d'évolution temporel est de la forme

$$ci(x) = c(x) + D * \frac{dt}{dx^2} * (c(x+1) + c(x-1) - 2 * c(x)) - k * c(x) * dt,$$

où c et ci sont les concentrations de CRY2 à la position x et respectivement aux temps t et $t+dt$. D est le coefficient de diffusion à une dimension de CIBN et k le coefficient de dissociation du complexe CRY2/CIBN.

Le recrutement n'a lieu que lorsque le temps t est un multiple de la période d'activation. Quand cette condition est vérifiée, nous modifions le terme précédent par l'ajout d'un terme supplémentaire :

$$ci(x) = ci(x) + A * \exp\left(\frac{-(x - x_0)^2}{2 * \sigma^2}\right),$$

où A est l'amplitude du recrutement, x_0 le centre de la zone de recrutement et σ la largeur à mi-hauteur de ce recrutement gaussien. Par ailleurs, dans cet exemple, j'ai considéré des limites aux bords absorbantes avec :

$$c(1) = c(100) = 0.$$

A noter que les conditions aux bords n'ont pas d'influence sur le résultat de ces simulations, les bords, d'une largeur de 100, étant très grands devant les longueurs caractéristiques de ce problème (avec $x_0=50$ et $\sigma << 100$). Ces simulations, qui sont un outil pour tester l'influence des paramètres du système, prédisent un état stationnaire (Figure 2-14).

Le niveau de cet état stationnaire dépend, en particulier, de la périodicité des pulses de lumière bleue. Sur ces courbes nous remarquons de plus que :

- la largeur de la distribution spatiale ne dépend pas du niveau final,
- ce niveau final est atteint lorsque le recrutement et la disparition du signal sont opposés sur une période d'activation,
- ce sont les deux phénomènes responsables des fluctuations autour du niveau final.

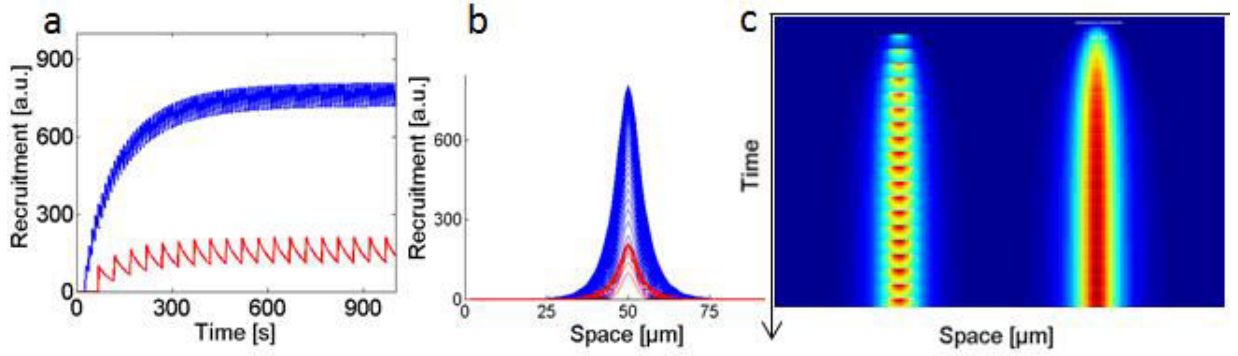


Figure 2-14 : Simulations numériques à une dimension de l'évolution spatiotemporelle du signal CRY2-mCherry à la membrane en fonction de la périodicité des activations. (a) Valeur du maximum de recrutement en fonction du temps pour une période de 10 (bleu) et 50 secondes (rouge). (b) Echantillon de profils spatiaux. (c) Kymographe de l'évolution du recrutement pour une période des pulses de 50 (gauche) et 10 secondes (droite).

Ce modèle n'est cependant pas parfait, nous pourrions l'améliorer en tenant compte de la conservation du nombre de protéine CRY2 total par exemple - en modifiant au cours du temps la valeur du paramètre A.

2.4.2 Etat stationnaire

Ces prédictions théoriques nous laissent penser qu'il est possible, à l'aide du système CRY2/CIBN, de contrôler indépendamment au cours du temps l'étendue spatiale et le niveau de protéines. Nous avons validé ce raisonnement par une caractérisation expérimentale de cet état stationnaire, en termes d'amplitude et d'étendue spatiale.

Distribution spatiale

En considérant l'équation (2.4), à une dimension, dans le cas d'une activation ponctuelle et continue, soit $S(x, t) = Q\delta(x_0, t)$, nous obtenons alors une réponse de forme Lorentzienne :

$$C_m(x|x_0, t) = \frac{\lambda Q}{2D} e^{-\frac{|x-x_0|}{\lambda}} \quad (2.5)$$

avec $\lambda = \sqrt{D/k_{diss}}$, la longueur caractéristique de ce problème de diffusion/dissociation. Cette grandeur est un des éléments-clés du système qui indique qu'il n'est pas possible de localiser un recrutement plus précisément que λ . D'après les valeurs de D et de k_{diss} obtenues précédemment, la valeur de λ doit être de l'ordre de 4,5 μm, ce que nous allons vérifier expérimentalement.

Pour simplifier le problème, je me suis placé dans un cas où la forme de la cellule est simple, régulière et reproductible. Les cellules ont été déposées sur des patrons de fibronectine

de forme circulaire et de diamètre compris entre 40 et 50 μm (Figure 2-15, b). Ces cellules, cotransfectées avec CRY2-mCherry et CIBN-GFP, sont illuminées périodiquement (un pulse toutes les 25 secondes) sur une région quasi-ponctuelle à droite, puis à gauche et enfin des deux côtés en même temps de la cellule (Figure 2-16).

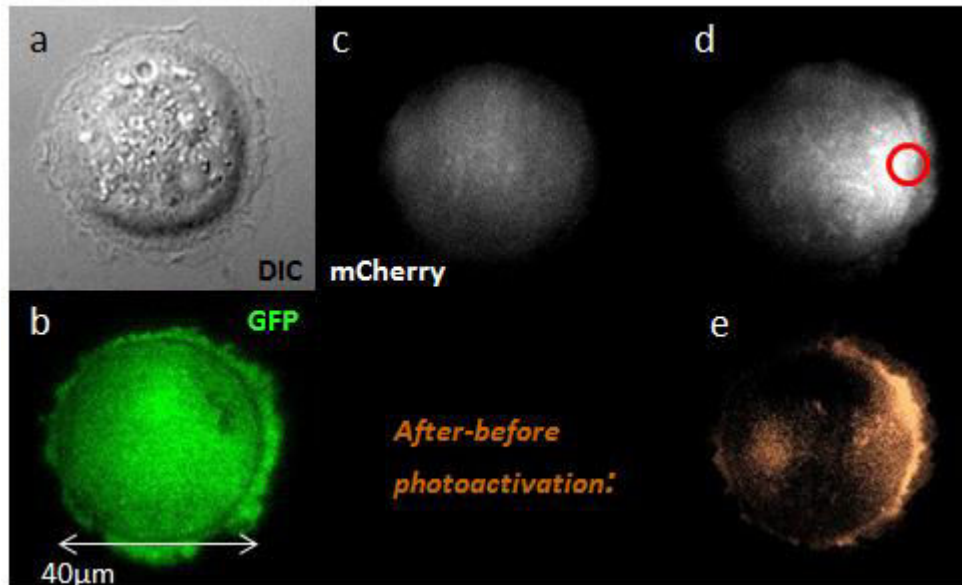


Figure 2-15 : Recrutement local de CRY2-mCherry. (a) Image DIC de la cellule HeLa, cotransfectée avec CRY2-mCherry et CIBN-GFP et étalée sur un patron rond de fibronectine (diamètre 40 μm). (b) Signal TIRF montrant la localisation de CIBN-GFP à la membrane au contact avec la lamelle. (c-d) Images TIRF de CRY2-mCherry avant (c) et après (d) l'illumination locale (cercle rouge) avec une période de 25 secondes entre chaque pulses. (e) Image différentielle des deux images TIRF mCherry. Hauteur des images : 60 μm .

Comme précédemment, nous sommes capables de recruter localement CRY2 à la membrane (Figure 2-15, d, e et Figure 2-16, a). Le kymographe de cette expérience (Figure 2-16, b) montre une montée progressive du niveau de fluorescence en même temps qu'un élargissement spatial du signal entre 2 minutes et 15 minutes après le début des activations. Quand l'équilibre entre recrutement, diffusion et dissociation est en place, la largeur et la hauteur du signal n'évoluent plus.

De plus, nous pouvons quantifier le gradient spatial obtenu lors des trois états stationnaires (représentés par les lignes blanches pointillées, Figure 2-16, indicateurs n°1, 2 et 4). Les profils obtenus sont correctement ajustés par des fonctions exponentiellement décroissantes (Eq. (2.5), en rouge sur la Figure 2-16, c) ce qui est en accord avec le couplage de la diffusion et la dissociation. La longueur caractéristique λ , obtenue lors de cette expérience, est comprise entre 7 et 8 μm , ce qui est supérieur aux 4,5 μm espérés. Cette différence s'explique par le fait que nous n'avons pas tenu compte de l'étape de diffusion cytoplasmique préalable à la formation du complexe CRY2/CIBN. En effet, le signal obtenu par un pulse de lumière unique avant la

diffusion possède déjà une certaine largeur - de l'ordre de la mi-hauteur de la cellule, soit de 1 à 5 μm - comme nous l'avons vu Figure 2-8.

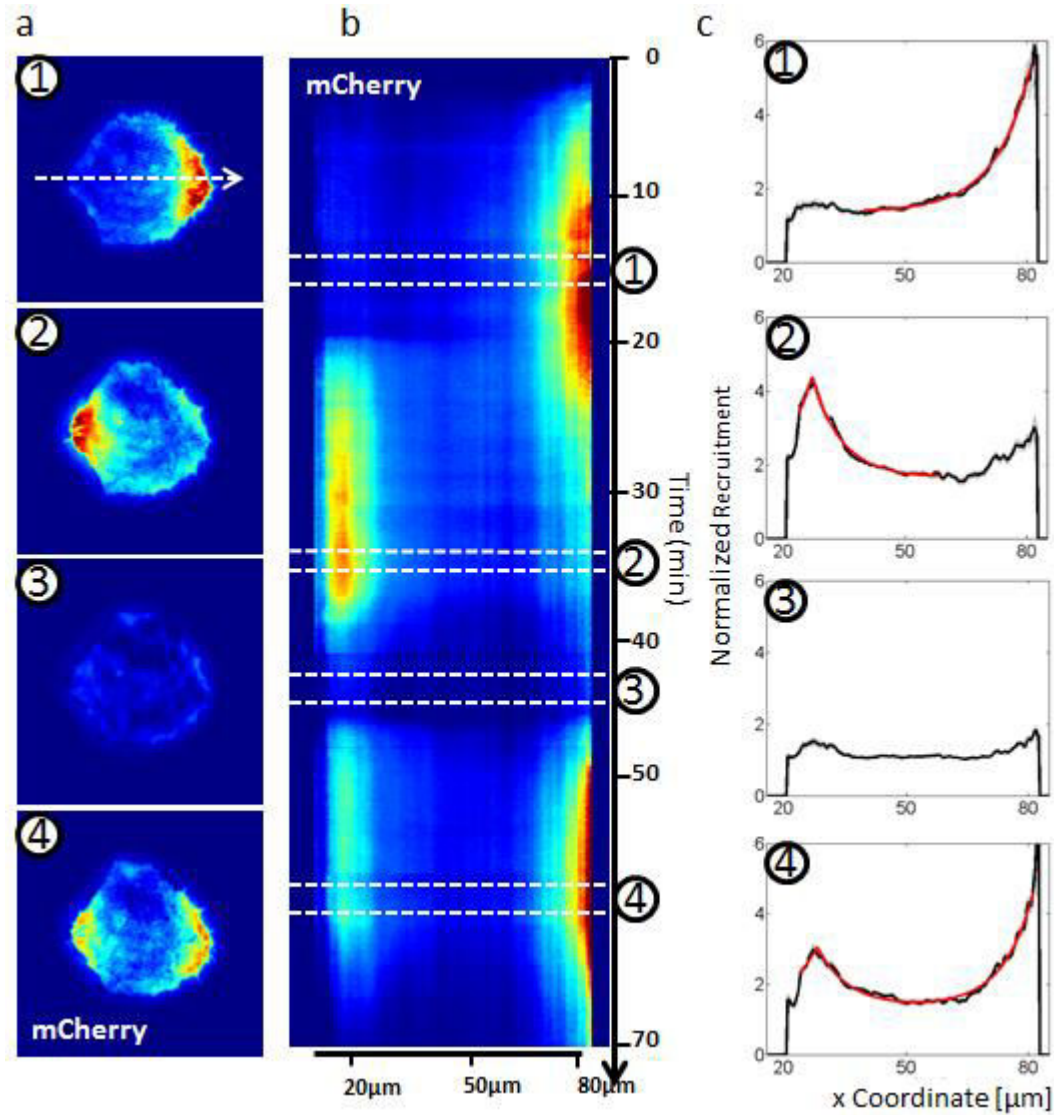


Figure 2-16 : Quantification d'une expérience de recrutement local sur une cellule étalée sur un patron de fibronectine rond de 50 μm . La lumière activatrice est envoyée avec une périodicité de 25 secondes à droite pendant 20 minutes puis à gauche pendant 15 minutes. Nous arrêtons alors l'activation pendant 10 minutes puis la reprenons des côtés à la fois. (a) Images TIRF du signal CRY2-mCherry à différents instants (1), (2), (3) et (4) moyennés sur 5 images successives. (b) Kymographe espace-temps de la valeur de fluorescence le long de la flèche blanche (a). (c) Quantification des profils de fluorescence aux quatre instants particuliers. En rouge, l'ajustement du profil à l'aide d'une fonction exponentiellement décroissante - Eq. (2.5).

Nous sommes donc capables de créer un recrutement local, dont le profil est exponentiellement décroissant. L'adéquation entre la description théorique et les observations expérimentales indiquant que nous tenons compte des principaux phénomènes physiques associés à ce système optogénétique.

Distribution globale de CRY2-mCherry

La connaissance de la réponse du système à une activation ponctuelle permet de connaître la réponse du système à n'importe quelle activation. Il est donc possible de créer n'importe quel type de recrutement en contrôlant le patron d'illumination. Théoriquement, le résultat final, en termes de recrutement, est la convolution entre la réponse à un point d'activation et la répartition spatiale de la source $S(x_0)$.

$$C_{m,stat} = \int dx_0 C_m(x|x_0, 0) S(x_0) \quad (2.6)$$

Pour se donner une idée de la manière dont sont transformés différents types de patrons d'illumination en un recrutement, nous avons calculé une approximation de ce produit de convolution en faisant la somme de différentes distributions Lorentziennes, dont le poids dépend de la forme théorique du patron.

Il est intéressant, en particulier, de comprendre quelle est la distribution spatiale de CRY2 obtenue, quand nous envoyons de la lumière bleue dans une région carrée, ou bien selon un gradient linéaire (Figure 2-17).

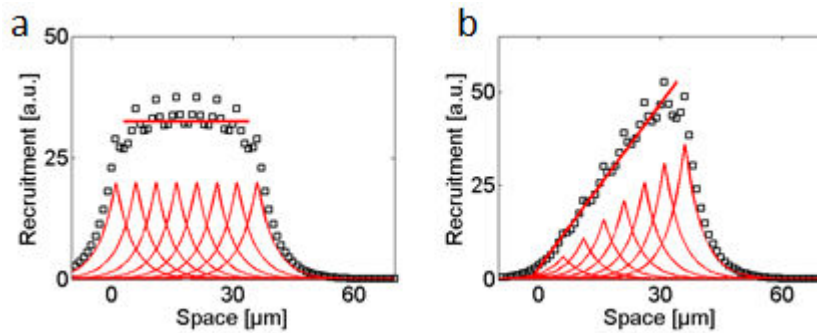


Figure 2-17 : Simulation de la photoactivation par un profil spatial carré (a) et un gradient linéaire (b). En rouge, courbe de réponse à chaque pulse local qui forme l'activation globale. En noir, somme de toutes ces réponses locales. Ligne rouge, fit linéaire des points noirs entre 0 et 30 μm .

Ces calculs montrent qu'un carré d'activation donne une distribution carrée, dont les bords sont exponentiellement décroissants et qu'un gradient linéaire de lumière crée un recrutement linéaire. Concernant ce point, le module de FRAP que nous utilisons ne peut pas créer de gradients linéaires d'activations, mais cela est tout à fait envisageable avec d'autres montages expérimentaux.

Expérimentalement, lors d'une activation dans une zone carrée, la distribution spatiale de CRY2 correspond bien à ce que nous avons prédit (Figure 2-18, b). En effet, un carré d'activation crée un profil carré de recrutement dans la région activée et un profil exponentiellement décroissant sur les bords de celle-ci. De plus, la longueur caractéristique de cette décroissance

varie peu au cours du temps, elle augmente de 3 à 5 μm lors de la mise en place de l'état stationnaire puis reste comprise entre 5 et 6 μm .

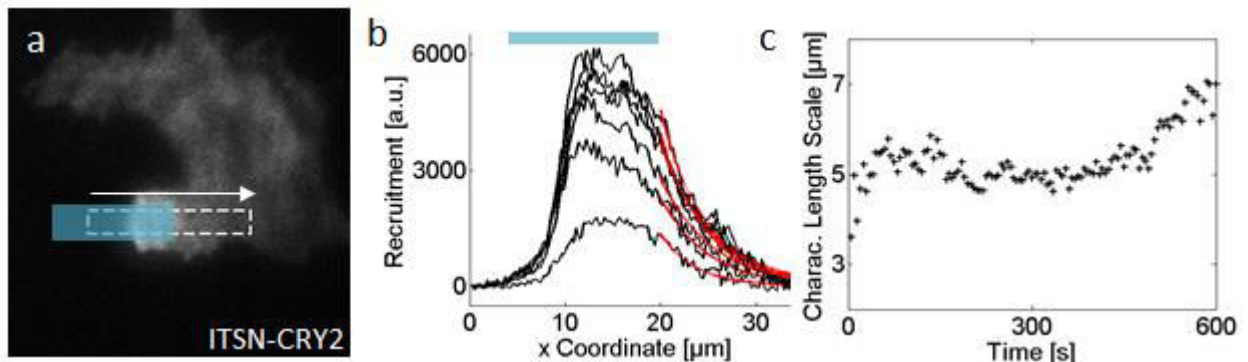


Figure 2-18 : Distribution spatiale du recrutement de CRY2. (a) Image TIRF d'une cellule cotransfectée avec CRY2 et CIBN. En bleu, zone d'activation. Hauteur de l'image : 90 μm . (b) En noir, profils de fluorescence obtenus le long de la flèche blanche de (a) pour différents temps lors de la formation de l'état stationnaire. En rouge, ajustement de ces courbes par une exponentielle décroissante. (c) Longueur caractéristique de la décroissance exponentielle pour les 600 premières secondes après activation

Modification du niveau de l'état stationnaire

Lorsqu'un état stationnaire est créé, il est possible d'en modifier le niveau en changeant les paramètres d'illumination, ce qui ne doit pas en modifier la largeur à mi-hauteur. C'est ce que nous avons vérifié en faisant varier, sur une même cellule, le temps d'exposition et la périodicité des pulses à chaque fois qu'un état stationnaire est atteint (Figure 2-19).

Lors des trois premières valeurs des paramètres d'illumination, l'amplitude maximale du signal atteint successivement 20, 40 et 60 pourcent du niveau initial de fluorescence. Dans le cas d'activations plus importantes où nous augmentons le temps d'exposition et la fréquence des pulses, nous obtenons des amplitudes maximales de 5, 7, et 9 fois le niveau de fluorescence basal. Concernant les profils spatiaux de ces états stationnaires, ils restent exponentiellement décroissants avec des valeurs de λ comparables sauf pour la plus forte activation. Dans le cas de cette activation, le signal déborde sur les bords de la zone d'activation, ce que nous expliquons par le fait que le nombre de CIBN-GFP, localement, n'est probablement pas suffisant pour que toutes les protéines CRY2-mCherry s'y fixent.

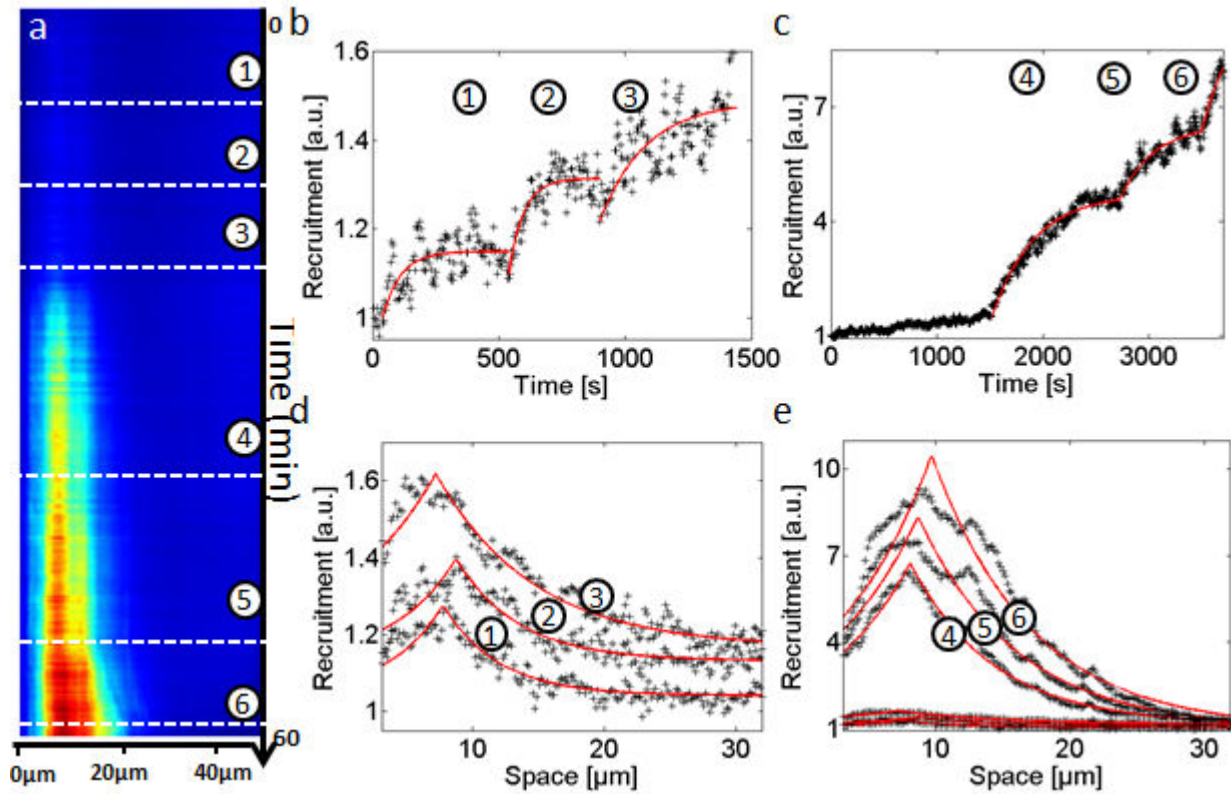


Figure 2-19 : Changement du niveau final de CRY2. (a) Kymographe d'une expérience de recrutement local de CRY2-mCherry pour une cellule étalée sur un patron rond de fibronectine. Chaque plage temporelle, de (1) à (6), est caractérisée par des paramètres d'illumination différents, que ce soit le temps d'exposition (Ex), ou la période des pulses (T). De (1) à (6), la valeur des couples $\{T(s), Ex(ms)\}$ est $\{50/3\}$, $\{30/6\}$, $\{10/6\}$, $\{15/9\}$, $\{10/9\}$, $\{5/15\}$. (b, c) Valeur moyenne, dans la zone de recrutement, de l'intensité de fluorescence au cours du temps, zoomé sur les 3 premières plages temporelles (b) où sur toute l'expérience (c). (d, e) Profils spatiaux au moment de l'état stationnaire de chaque plage temporelle (en noir) et leur ajustement exponentiellement décroissant (en rouge) pour les plages de (1) à (3) (d) et de (1) à (6) (e).

2.5 Contrôle quantitatif du niveau de l'état stationnaire

L'utilisation du système CRY2/CIBN nous permet d'effectuer des recrutements dont il est possible de modifier la distribution spatio-temporelle. Jusqu'à présent nous n'étions que spectateurs du changement de niveau lorsque nous changions les paramètres d'illumination. Il a donc été nécessaire de trouver une approche pour prédire le niveau que nous souhaitons atteindre en fonction de ces paramètres.

2.5.1 Choix du niveau final

Les relations entre recrutement d'une part et temps d'exposition et puissance des lasers d'autre part (Figure 2-10) ne sont pas linéaires. Modifier ces paramètres ne semble donc pas être la manière la plus reproductible pour modifier le niveau du recrutement. Un autre levier utilisable pour déplacer l'état final est la périodicité à laquelle nous envoyons les pulses de lumière. En pratique, c'est une méthode efficace car :

- elle ne nécessite pas la mise en pause de l'observation pour modifier les caractéristiques de l'illumination,
- elle permet en parallèle de continuer de prendre des images tant que sa fréquence et sa durée restent inférieures à celles des films.

Dans la suite nous proposons un modèle simple pour décrire le comportement du recrutement en fonction de la période des pulses T . Soient N_n et N_n^* le nombre de protéines CRY2-mCherry à la membrane juste avant (respectivement juste après) le $n^{\text{ème}}$ pulse de lumière bleue. Soit I_n le nombre de CRY2-mCherry dans le cytoplasme. La conservation de la quantité totale de CRY2 implique que pour tout n l'équation suivante est satisfaite :

$$N_n + I_n = I_0,$$

où I_0 est la quantité initiale de protéine CRY2 dans la cellule. Le nombre de CRY2-mCherry au temps $n + 1$ est le nombre juste après l'activation précédente N_n^* , multiplié par la probabilité de se dissocier pendant l'intervalle de temps T :

$$N_{n+1} = N_n^* e^{-\frac{T}{\tau}}.$$

La valeur de τ à considérer dans le cas d'une activation globale est le temps de dissociation de l'ordre de 180 secondes. Dans le cas d'activations locales, τ est parfois plus petit du fait de la diffusion à la membrane.

Le nombre de protéines juste après une activation est égale au nombre de protéines juste avant cette activation plus le nombre de protéines recrutées par ce pulse - et proportionnel à la concentration cytoplasmique - d'où :

$$N_n^* = N_n + f * I_n,$$

et l'obtention de l'équation :

$$N_{n+1} = [N_n(1 - f) + f I_0] e^{-\frac{T}{\tau}},$$

dont la solution est :

$$N_n = \frac{1 - (1 - f)^n e^{-\frac{T}{\tau}}}{1 - (1 - f) e^{-\frac{T}{\tau}}} f I_0 e^{-\frac{T}{\tau}}. \quad (2.7)$$

Détermination de f et I_0 à partir d'un état stationnaire

L'équation (2.7) possède deux inconnues : f et I_0 . Expérimentalement ; le produit $f I_0$ est déterminé à partir du niveau final de la première courbe (Figure 2-20, a), effectuée avec une période très grande par rapport à τ ($T = 1s$), et la valeur de $f = 0,2$ est déterminée à l'aide du premier pulse de lumière (Figure 2-20)

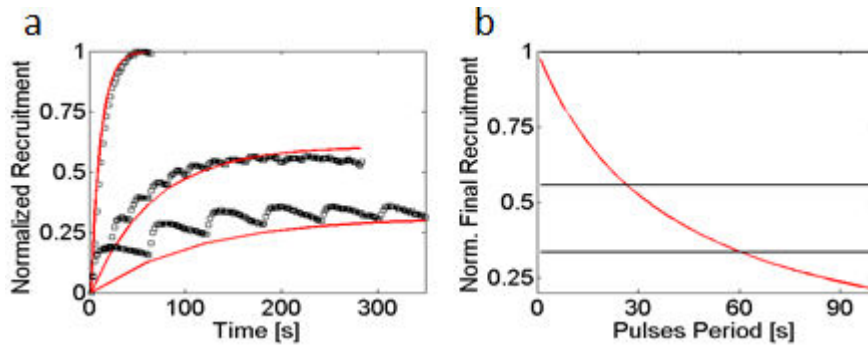


Figure 2-20 : Contrôle quantitatif du niveau de recrutement en fonction de la périodicité. (a) En noir, signal TIRF de CRY2-mCherry au cours du temps, sur une même cellule, pour trois périodes différentes de photoactivation : $T = 1s$, $T = 20s$, $T = 60s$. En rouge, prédiction théorique des niveaux de fluorescence. (b) En rouge, prédiction théorique du niveau final de fluorescence en fonction de la périodicité des pulses. En noir sont tracées les deux lignes correspondant aux niveaux finaux obtenus expérimentalement. Les intersections entre lignes noires et courbe rouge permettent de remonter à la périodicité théorique des pulses.

A partir de ces valeurs, nous avons tracé au cours du temps les valeurs des N_n (courbes rouges, Figure 2-20, a) et les avons comparées avec les valeurs expérimentales obtenues

(courbes noires). Nous observons que résultats théoriques et résultat expérimentaux ont le même aspect.

De ce modèle, nous caractérisons l'état stationnaire par le fait que $N_n = N_{n+1} = N_\infty$ ce qui détermine la dépendance de N_∞ en fonction de T :

$$N_\infty = \frac{f I_0}{e^{\frac{T}{\tau}} - (1 - f)} \quad (2.8)$$

La représentation de N_∞ en fonction de T (courbe rouge, Figure 2-20, b), superposée aux lignes correspondant aux niveaux finaux atteints expérimentalement (courbes noires) détermine la valeur théorique de la périodicité des pulses. Ces niveaux correspondent à des périodes de l'ordre de 26 et 60 secondes, ce qui est en bon accord avec les périodes de 20 et 60 secondes réellement utilisées.

Détermination de f et I_0 à partir de deux pulses de lumière

Cette méthode pour contrôler le niveau de CRY2 n'est pas totalement satisfaisante du fait de la manière de détermination des paramètres f et I_0 . Elle implique en effet d'effectuer une expérience préalable de recrutement avec une fréquence très rapide, ce qui génère des niveaux de recrutement très importants. Ce type de recrutement sera peut-être impossible à réaliser lorsque ce système sera couplé avec des protéines impliquées dans un réseau de signalisation biologique. Nous avons donc imaginé une approche simple à mettre en œuvre pour déterminer ces deux paramètres sans trop perturber le système. A partir de deux petits recrutements successifs, il est possible d'extraire les valeurs de f et I_0 et ainsi prédéterminer le niveau de l'état stationnaire. En reprenant les notations précédentes, nous pouvons écrire :

$$N_1^* = f I_0,$$

$$N_2^* = p I_0 * \left(1 + (1 - f) e^{-\frac{T}{\tau}} \right),$$

d'où l'obtention de f et I_0 :

$$f = 1 - \left(\frac{N_2^*}{N_1^*} - 1 \right) e^{+\frac{\Delta t}{\tau}},$$

$$I_0 = \frac{N_1^*}{f}.$$

J'ai donc réalisé des expériences où j'envoyais sur les cellules deux pulses de lumière. Je laissais alors le recrutement disparaître puis effectuais un recrutement jusqu'à obtenir un état stationnaire (Figure 2-21, a). J'ai pu alors comparer le niveau final obtenu à celui espéré en tenant compte des paramètres f et I_0 extraits des deux premières activation (Figure 2-21, b, c). Les résultats obtenus ont le bon ordre de grandeur attendu. La mesure de N_1^* et N_2^* étant cependant très bruitée, la détermination de ce niveau final est précise de l'ordre de 30%.

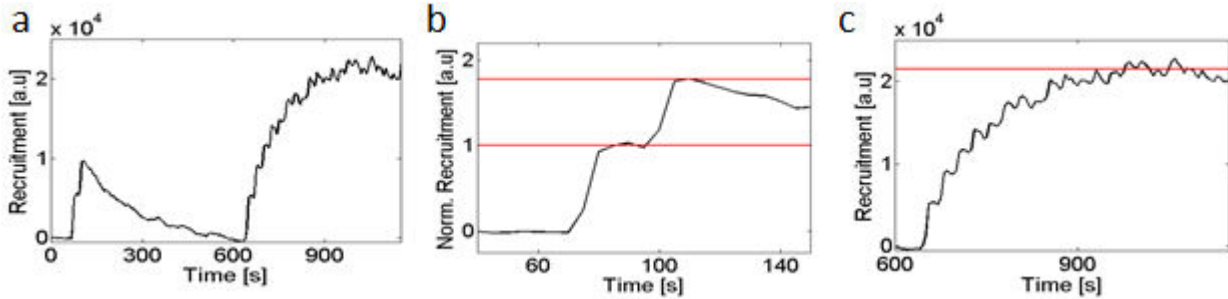


Figure 2-21 : Détermination des paramètres f et I_0 à partir de deux pulses simples et prédiction du niveau final de recrutement. (a-c) Signal TIRF au cours du temps. La cellule est éclairée localement d'abord avec deux pulses espacés de 25 secondes, puis, après 10 minutes de pause, avec une activation régulière de période 25 secondes. (b) Zoom sur les deux premiers pulses d'activation normalisés par la hauteur du premier pulse. En ligne rouge, niveau N_1^* et niveau N_2^* . (c) Zoom sur la deuxième partie de l'expérience. Ligne rouge, niveau final attendu en tenant compte des valeurs de f et I_0 obtenues à partir de N_1^* et N_2^*

2.5.2 Diminution du temps de montée à l'état stationnaire

Nous sommes capables de contrôler quantitativement le niveau final d'un recrutement de CRY2-mCherry, cependant, il est toujours soumis à la dynamique naturelle de montée vers le niveau final - dynamique fixée par les caractéristiques d'illumination. Nous avons imaginé changer la périodicité des pulses au cours du temps pour atteindre l'état stationnaire en un nombre d'images minimum. Pour le faire, il faut d'abord déterminer le nombre n de pulses requis pour atteindre une fraction x de l'état stationnaire N_∞ qui nous interesse : $N_n = xN_\infty$. D'où

$$\frac{1 - (1 - f)^n e^{-\frac{T}{\tau}}}{1 - (1 - f)e^{-\frac{T}{\tau}}} f I_0 e^{-\frac{T}{\tau}} = x \frac{1}{1 - (1 - f)e^{-\frac{T}{\tau}}} f I_0 e^{-\frac{T}{\tau}}$$

$$1 - x = (1 - f)^n e^{-\frac{T}{\tau}}$$

$$n = \frac{\ln(1 - x)}{\ln(1 - f) - T/\tau} \quad (2.9)$$

Par exemple, pour $T = 20s$ et $x = 0,9$ (avec $f = 0,2$ et $\tau = 180s$), nous obtenons $n \sim 7$ soit 140 secondes. Il faut donc 140 secondes pour atteindre un recrutement de 90 pourcent du niveau final pour une période de 20 secondes si $f=0.2$.

Nous calculons de la même manière le nombre n_f de pulses nécessaires à atteindre le même niveau final, avec une périodicité $T_2 < T$. Nous obtenons alors

$$n_f = \frac{\ln(1 - x_f)}{\ln(1 - f) - \Delta t_f/\tau}$$

$$x_f = \frac{e^{\Delta t_f/\tau} - (1 - f)}{e^{\Delta t/\tau} - (1 - f)} \quad (2.10)$$

En choisissant $T_2 = 5s$, nous obtenons $n_f \sim 4$ pulses, soit 20 secondes. Il est donc possible de réduire le temps de montée d'un facteur 7. Nous avons réalisé ce type d'expérience (Figure 2-22) ce qui a réduit significativement le temps de montée au niveau final, tout en reprenant aussitôt l'activation de période T pour ne pas dépasser le niveau visé.

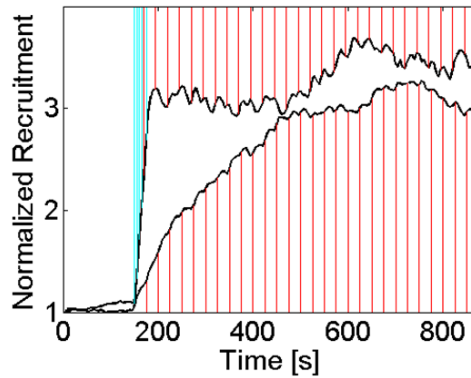


Figure 2-22 : Raccourcir le temps de montée à l'état stationnaire. En noir, signal TIRF de CRY2-mCh normalisé par la valeur moyenne avant activation. Dans le cas de la courbe montant progressivement, il est envoyé un pulse de lumière bleue toutes les 25 secondes. Dans le cas de la montée rapide, cinq pulses de lumière bleue espacés de 5 secondes sont initialement envoyés suivis d'une activation régulière de période 25 secondes.

2.6 Résumé

Utiliser un microscope TIRF et un module de FRAP permet le recrutement et l'observation de CRY2 à la membrane.

Les phénomènes régissant la distribution spatiotemporelle de CRY2 à la membrane sont la diffusion cytoplasmique de CRY2, la diffusion membranaire de CIBN et la dissociation du complexe.

La réponse spatiale à un pulse unique de lumière bleue est une distribution spatiale gaussienne. Dans le cas d'un pulse maintenu au cours du temps, nous obtenons un profil lorentzien.

En régime stationnaire, la connaissance de la réponse du système à un pulse de lumière permet de créer n'importe quel type de distribution spatiale de CRY2. De plus, l'étendue spatiale et le niveau du recrutement sont indépendants.

CRY2 peut être recruté localement avec une résolution spatiale d'environ 5 μm et une résolution temporelle de 3 minutes.

Les paramètres d'illumination, en particulier la puissance et la durée d'excitation des pulses de lumière ainsi que leur fréquence modifient le niveau de protéines recrutées.

Ce niveau final ainsi que le temps de montée à ce niveau peuvent être choisis préalablement à l'expérience en modifiant la fréquence des pulses de lumière.

Chapitre 3 Migration par les RhoGTPases

L'étude précise des caractéristiques du système CRY2/CIBN a rendu possible la création de localisations subcellulaires de CRY2, sur des distances de l'ordre de 5 μm et avec une résolution temporelle de l'ordre de 3 minutes. L'activité endogène des RhoGTPases, observée avec les sondes de FRET, possède des distances caractéristiques de l'ordre de 0 à 10 μm et des temps caractéristiques de 30 secondes à 2 minutes. Par conséquent, ce système optogénétique possède les caractéristiques requises pour contrôler la distribution de protéine d'intérêt sur des échelles spatiotemporelles comparables à celles endogènes des RhoGTPases

Dans ce chapitre, nous présenterons la stratégie de clonage employée pour activer localement les RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA et nous vérifierons expérimentalement cette activité. Nous décrirons ensuite de manière qualitative et quantitative les modifications phénotypiques locales qu'une activation entraîne sur la cellule – modifications qui seront abordées d'un point de vue moléculaire dans le Chapitre 4.

Nous verrons également, sur l'exemple de Cdc42 et de RhoA, qu'une perturbation locale du réseau de signalisation des RhoGTPases, maintenue au cours du temps, peut être intégrée à l'échelle de la cellule entière et entraîner un déplacement globale de celle-ci.

Ensuite, nous présenterons une approche pour étudier, de manière systématique, le passage d'un état de polarisation à un autre, en couplant deux techniques expérimentales : l'optogénétique et les micropatrons de fibronectine. Nous aborderons enfin quelques éléments de réflexion pour comprendre le phénomène de régulation de l'activité de la membrane à longue distance.

3.1 Contrôle local de l'activité de RhoGTPases

Dans cette thèse, nous cherchons une stratégie pour activer les RhoGTPases, permettant :

- de ne pas surexprimer une protéine ayant par elle-même un effet sur les cellules
- d'atteindre des modifications phénotypiques de l'ordre de celles qui existent naturellement dans les cellules.

Par exemple, fusionner une RhoGTPase constitutivement active à CRY2-mCherry et la localiser à la membrane ne respecte pas le second point, car nous ne contrôlons pas le nombre de RhoGTPase à la membrane par rapport à la quantité endogène. La stratégie que nous avons utilisée est une idée adaptée de l'article (69) et réutilisée une fois depuis dans notre laboratoire (83). Nous l'avons adaptée au système CRY2/CIBN, pour contrôler l'activité endogène de Cdc42 et Rac1, et généralisée à la voie de signalisation de RhoA.

3.1.1 Constructions moléculaires

La méthode utilisée (Figure 1-33) se base sur une particularité des Guanine Exchange Factor (GEF), les activateurs de RhoGTPases, à savoir leurs structures en domaines (Figure 1-13). En enlevant de ces protéines tous les domaines impliqués dans la localisation et la régulation et de ne conserver que le domaine spécifique d'activation des RhoGTPases (domaine catalytique DHPH), ceci les empêche d'être localisées à la membrane, là où se situent les réserves de RhoGTPases. L'étape suivante est la création d'une protéine de fusion entre ce domaine DHPH et la molécule CRY2-mCherry. En faisant exprimer aux cellules cette protéine en parallèle à CIBN-GFP, en l'absence de lumière, la protéine GEF_DHPH-CRY2 diffuse librement dans le cytoplasme, mais en présence de lumière bleue, elle change de conformation, diffuse jusqu'à la membrane et se fixe à CIBN (Figure 3-1). La localisation du domaine DHPH des GEF, à proximité de la membrane, active les RhoGTPases endogènes à cet endroit.

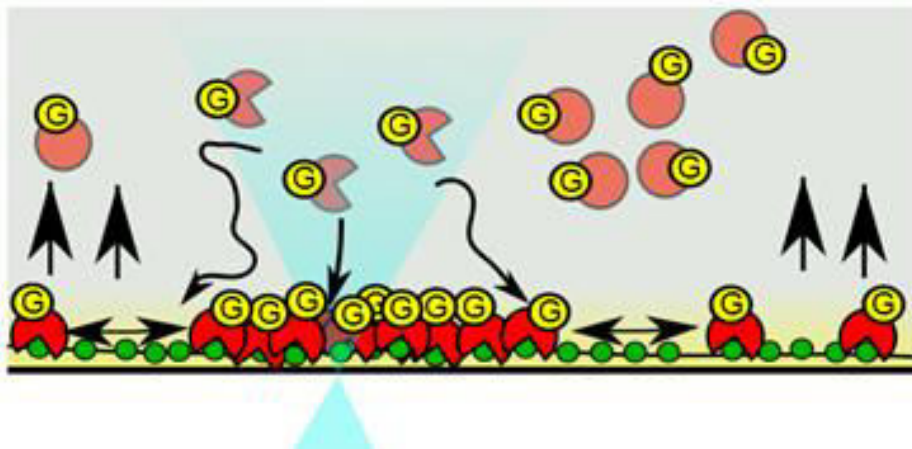


Figure 3-1 : Schéma résumé des processus en jeu lorsque GEF_DHPH-CRY2 est photoactivée localement. Les rouds jaune fusionnés à CRY2-mCherry correspondent aux domaines DHPH des GEF

J'ai construit trois plasmides dans le but d'activer Rac1, Cdc42 et RhoA. Les deux premiers domaines DHPH, Tiam1 (noté Tiam1) et Intersectin (noté ITSN), que j'ai fusionné à CRY2-mCherry ont été récupérés des plasmides utilisés dans la publication (69) et activent respectivement Rac1 et Cdc42 (Figure 1-33). Concernant RhoA, il était important de trouver une GEF spécifique uniquement de cette RhoGTPase. Il est ressorti de conversations avec Guillaume Charras, Mathieu Piel et Buzz Baum que les GEF p115-RhoGEF (84)(85) et ArhGEF11 (appelée également PDZ-RhoGEF)(86) pourraient remplir ce rôle. A partir des bases de données protéiniques (en particulier www.uniprot.org), il est possible de connaître les différents domaines d'interaction présumés ou observés de ces protéines. Cela m'a permis d'en déterminer leurs domaines DHPH que j'ai fait synthétiser et insérer dans le vecteur de CRY2-mCherry.

3.1.2 Sondes fluorescentes des RhoGTPases

Notre approche consiste à perturber un réseau de signalisation afin d'observer les conséquences sur la morphologie de la cellule et la localisation de certaines protéines. Ceci suppose d'observer en fluorescence d'autres protéines que CRY2/CIBN. Cependant, il est impossible d'utiliser de lumière en dessous de 530 nm pour faire des images d'une cellule sans recruter CRY2-mCherry partout à la membrane. Cela signifie que les protéines fluorescentes BFP, CFP, GFP et YFP (*Blue, Cyan, Green and Yellow Fluorescent Protein*) ne sont pas utilisables. Il a été découvert en 2011 la protéine iRFP (*infraRed Fluorescent Protein*)(87) dont le pic d'absorption est proche de 642 nm et celui d'émission autour de 710 nm. Nous avons testé cette protéine et déterminé qu'un signal mCherry et un signal iRFP pouvaient être observés en parallèle, sans modifier la localisation cytoplasmique de CRY2-mCherry, et sans *crosstalk* entre ces deux fluorophores.

Ce n'est pas l'unique méthode pour observer un signal fluorescent sans modifier le recrutement de CRY2-mCherry. Dans le cas de recrutements locaux importants, nous pouvons utiliser un rapporteur associé à une GFP. L'expérience consiste à activer CRY2 régulièrement et localement avec le module FRAP et à réaliser, de temps en temps, une image globale de la cellule en GFP en utilisant très peu d'intensité lumineuse (une fois toutes les vingt activations par exemple). Cette image en GFP rend possible l'observation d'un rapporteur sans modifier de manière significative le recrutement précédent – le cytoplasme étant largement déplété en CRY2 et la puissance lumineuse étant très faible. Cette technique a l'avantage de permettre aux chercheurs d'utiliser leurs plasmides GFP, sans les transformer en iRFP. Elle nécessite cependant la création du plasmide CIBN auquel il a été retiré la GFP. La preuve expérimentale de la transfection avec CIBN est alors notre aptitude à réaliser un recrutement local ou non.

Dans cette thèse, je me suis restreint à l'utilisation de protéines couplées à iRFP afin d'observer des effecteurs en continu.

3.1.3 Activation subcellulaire de Rac1 et de Cdc42

Pour regarder l'activité de RhoGTPase, les outils les plus précis sont les sondes de FRET (Figure 1-19, b). Cependant, ces sondes ne sont pas compatibles avec le système CRY2/CIBN. Elles ont été développées en effet pour des couples de fluorophores dont un, au moins, doit être regardé avec une illumination en dessous de 530 nm. Une autre méthode pour quantifier cette activité est de regarder la localisation d'effecteur de ces RhoGTPases. Dans cette optique, j'ai fabriqué un plasmide codant une fusion entre iRFP et le domaine d'interaction de PAK1 (PBD), domaine spécifique de Cdc42 et de Rac1 lorsqu'ils sont actifs (Figure 1-19, a).

Nous avons donc transfecté des cellules HeLa avec les plasmides CIBN-GFP, Tiam1-CRY2-mCherry et PBD-iRFP, pour lesquelles l'illumination locale se traduit alors par un recrutement local de Tiam1-CRY2 à la membrane (Figure 3-2, a, b). Le signal PBD-iRFP initialement réparti de manière homogène dans la cellule s'enrichit dans la zone de recrutement de Tiam1 (Figure 3-2, c, d), ce qui indique l'activation de Rac1. Le suivi des intensités de fluorescence iRFP et mCherry au cours du temps indique que ces deux signaux, en plus d'être corrélés spatialement, sont corrélés temporellement (Figure 3-2, e).

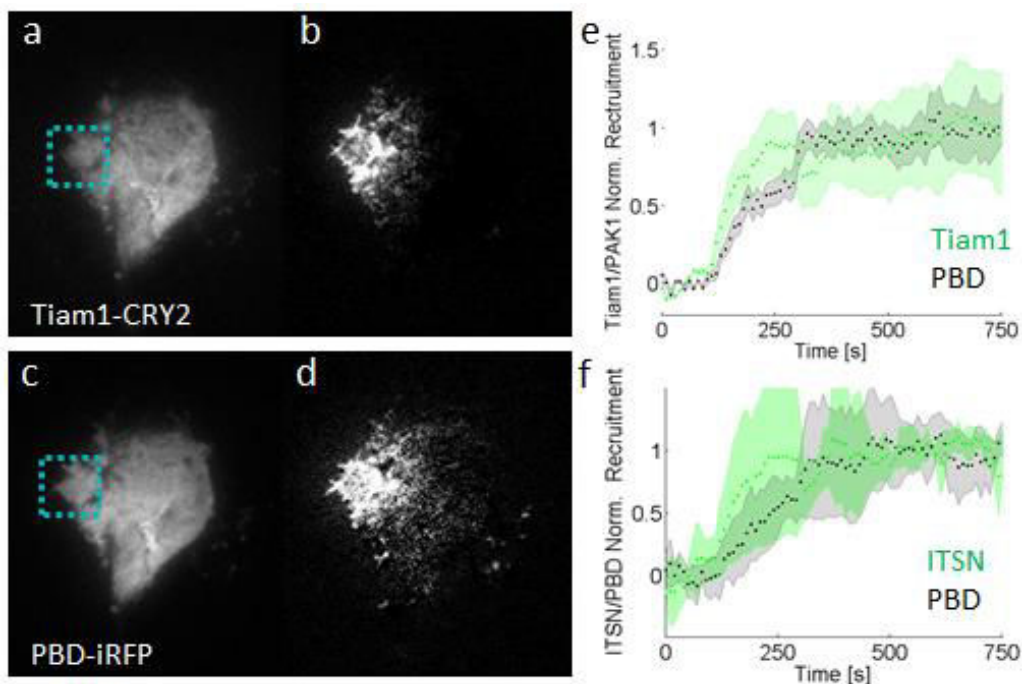


Figure 3-2 : Activation locale de Rac1 et Cdc42. (a-d) Signal TIRF de Tiam1-CRY2 (a) et de PBD-iRFP (c) avant activation. (b, d) Signal différentiel de Tiam1 (b) et PBD (d) entre 100 secondes après le début des activations et avant. La région d'activation est représentée par le carré en pointillés bleus. Hauteur des images : 60 μm . (e) Quantification, dans la zone d'activation, au cours du temps, du recrutement de Tiam1 (en vert) et de PBD (en noir) normalisés entre 0 et 1 pour cinq cellules. (f) Quantification, dans la zone d'activation, au cours du temps, du recrutement de ITSN (en vert) et de PBD (en noir) normalisé entre 0 et 1 pour six cellules.

De la même manière, le recrutement local de ITSN-CRY2-mCherry à la membrane entraîne une augmentation du signal PBD-iRFP (Figure 3-2, f), ce qui indique l'activation de Cdc42.

Ces recrutements de PBD-iRFP valident notre méthode : nous activons bien les RhoGTPases Cdc42 et Rac1. Nous notons sur ces expériences qu'un recrutement local de GEF_DHPH-CRY2 crée également un recrutement d'effecteur local, ce qui peut être interprété de deux façons. Soit les RhoGTPases ne diffusent pas ou peu relativement aux GEF_DHPH-CRY2, soit elles sont rapidement désactivées lorsqu'elles sortent de leur zone d'activation. Ces expériences, réalisées à 0,1 Hz (1 image par 10 secondes), ne présentent pas de délai significatif entre les deux signaux de fluorescence mCherry et iRFP. L'activation des RhoGTPases, précédant ce recrutement de PBD, est donc plus rapide que la dizaine de secondes. D'autres expériences réalisées au laboratoire avec Tiam1 laissent supposer que ces interactions interviennent avec des temps caractéristiques de l'ordre de la seconde.

3.1.4 Activation subcellulaire de RhoA

Pour regarder l'activité cellulaire de RhoA, nous avons fait synthétiser le plasmide codant la fusion entre iRFP et le domaine d'interaction de la protéine Rhotekine avec RhoA (RBD)(88). Un recrutement local de ArhGEF11-CRY2-mCherry (ARH-CRY2-mCherry) s'accompagne alors d'une augmentation du signal fluorescent RBD-iRFP (Figure 3-3, a-d) indiquant que RhoA est effectivement activée localement.

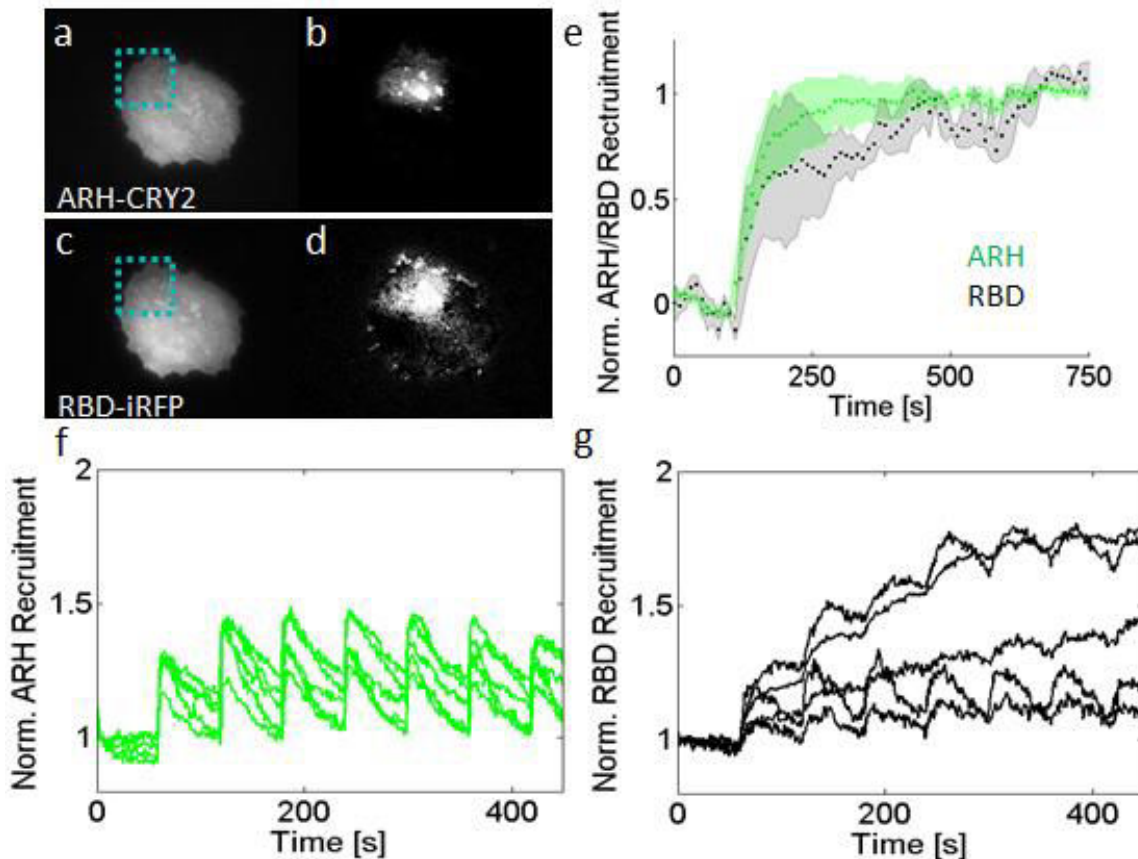


Figure 3-3 : Activation locale de RhoA. (a-d) Signal TIRF de ARH-CRY2 (a) et de RBD-iRFP (c) avant activation. (b, d) Signaux différentiels de ARH (b) et RBD (d) entre 100 secondes après le début des activations et avant. La région d'activation est représentée par le carré en pointillés bleus. Hauteur des images : 40 μm . (e) Quantification, dans la zone d'activation, au cours du temps, du recrutement de ARH (en vert) et de RBD (en noir) normalisée entre 0 et 1 pour huit cellules. (f, g) Quantification à 1 Hz du recrutement de ARH sur cinq cellules (f) tout en regardant en même temps le signal RBD (g)

A une fréquence de 0,1 Hz, il n'est pas possible de différencier le recrutement de ARH et celui de RBD. En augmentant la fréquence d'imagerie à 1 Hz les recrutements de RBD suivent la dynamique de ARH avec un décalage temporel n'excédant pas 5 secondes (Figure 3-3, f, g). L'activation de RhoA par ARH-CRY2 est donc plus rapide que 5 secondes.

3.2 Modification locale des propriétés de la cellule

Nos expériences démontrent la capacité de cet outil optogénétique à créer une activation locale des RhoGTPases Rac1, Cdc42, RhoA. Nous allons ainsi étudier l'effet de cette perturbation sur les réseaux de signalisation présents. Les RhoGTPases étant connues pour modifier la morphologie des cellules, nous allons prêter attention, en particulier, aux propriétés locales de celles-ci et en mesurer certaines caractéristiques telles que l'activité membranaire locale et le type de structure s'y développant.

3.2.1 Analyse d'image

Nous présentons ici les outils développés à partir de routines Matlab pour analyser les images DIC et TIRF et quantifier les modifications morphologiques observées. Il s'agit, en particulier, de déterminer le contour des cellules, de quantifier au cours du temps le mouvement de membrane et d'observer le déplacement de structures internes.

Deux sortes d'analyses, qualitatives et quantitatives, peuvent être effectuées sur ces images en respectant certaines règles - pour ne pas biaiser les résultats. Les analyses qualitatives ont pour but de souligner et/ou de révéler la présence de structures cellulaires locales/globales particulières. La détermination du contour cellulaire, à partir d'image DIC, fait partie de ces cas où les propriétés de l'image et les valeurs du contraste sont modifiables de manière non homogène, quitte à saturer certains pixels (Figure 3-4).

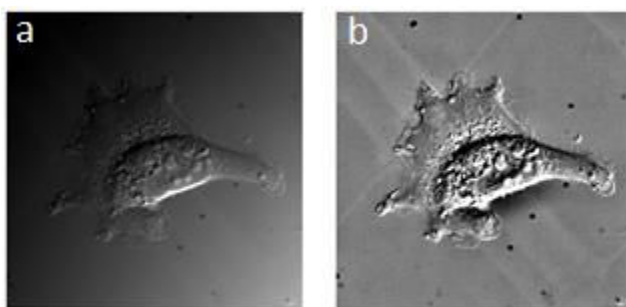


Figure 3-4 : Exemple de filtrage d'image. (a) Image DIC non filtrée d'une cellule HeLa sur un patron arbalète de diamètre 45 μm . La valeur du gradient de luminosité est obtenue grâce à un filtre gaussien de largeur la demi largeur de l'image. En divisant alors l'image (a) par l'image filtrée et en jouant sur le contraste, nous obtenons l'image (b), dont les détails sont davantage visibles. Hauteur de l'image : 72 μm .

Ce n'est pas le cas, en revanche, des analyses quantitatives, en particulier lors de quantifications des niveaux de fluorescence, pour lesquelles la valeur de chaque pixel compte. Dans ce deuxième cas, leur normalisation également est importante et doit être justifiée en fonction de ce que représente le signal de fluorescence - comme nous l'avons abordé dans le Chapitre 2.

Détermination du contour d'une cellule

Afin d'étudier les changements morphologiques d'une cellule, il est important de suivre son contour, de manière automatique, au cours du temps. La méthode développée est différente en DIC et en fluorescence de par la manière dont l'information est contenue dans ces images.

Dans le cas d'images de fluorescence, l'idée principale est d'en extraire le signal du bruit. Pour différencier les pixels qui correspondent à des protéines fluorescentes réelles, nous pouvons déterminer d'abord le niveau du bruit de cette image par l'utilisation de la fonction « graythresh » par exemple. En ne conservant alors que les pixels supérieurs à cette valeur, nous obtenons une image binaire (Figure 3-5, d, e). Si ces images ont été sur-échantillonnées temporellement, nous pouvons éventuellement commencer par moyenner sur deux images consécutives les signaux de fluorescence, ce qui en diminue le bruit.

Dans le cas d'une image DIC, l'approche est différente. Ce type de microscopie révèle les différences d'indices optiques locaux, ce qui met en avant les contours de la cellule notamment. Une cellule sans variation d'indice apparaît homogène et grise, alors qu'à la transition entre une membrane et un liquide extérieur, là où la différence d'indice est importante, le signal passe brutalement du blanc au noir - ou inversement. Nous recherchons donc, dans l'image, ces différences rapides de contraste. Pour cela, nous utilisons la fonction Matlab « edge », qui est basée sur l'utilisation d'un filtre de Sobel, qui calcule une approximation des gradients de l'image, à partir de la valeur des pixels les plus proches. Le résultat est une image binaire, constituée de pixels blancs au niveau des zones de forte variation d'indice (Figure 3-5, a, b).

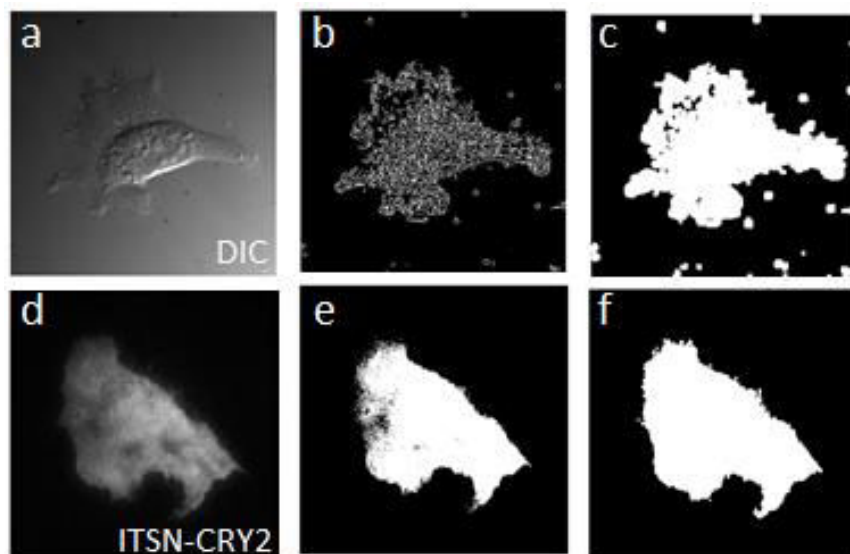


Figure 3-5 : Méthode d'extraction des contours. (a) Image DIC identique à celle présentée Figure 3-4. En appliquant la fonction « edge » nous obtenons (b). (d) Signal TIRF d'une cellule HeLa exprimant un plasmide mCherry. En ne conservant que les pixels supérieurs au niveau de bruit, une image binaire est obtenue (e). Les images (c) et (d) sont les résultats d'une dilatation des pixels des images (b) et (e). Hauteur des images (a-c) : 72 μm , (d-f) : 132 μm

A partir de ces images binaires, les étapes suivantes sont identiques. Nous cherchons un objet de forme fermée et d'aire supérieure à $25 \mu\text{m}^2$. Nous pouvons donc dilater les pixels blancs pour joindre les différentes régions, remplir les pixels noirs en leur sein et supprimer toutes celles de taille inférieure à $25 \mu\text{m}^2$ (Figure 3-6).



Figure 3-6 : Dernières étapes de la détermination du contour d'une cellule. Ces images correspondent à la suite de l'analyse d'image précédente. (a) Image obtenue après avoir rempli les trous présents dans les différentes régions de l'image (Figure 3-5, c). (b) Image obtenue ensuite, après avoir supprimé les régions inférieures à $25 \mu\text{m}^2$ et après avoir érodé les régions d'autant qu'elles avaient été dilatées (c). L'image (d) représente l'image initiale corrigée pour le gradient de luminosité sur laquelle est surimprimé en blanc le contour, déterminé à partir du périmètre de la région de l'image (c). Hauteur des images (a-d) : $72 \mu\text{m}$

Pour pallier à l'étape précédente de dilatation des pixels, il faut éroder les régions restantes d'autant qu'elles avaient été dilatées. Pour obtenir le contour des cellules, il suffit alors d'en considérer le périmètre. Toutes les propriétés géométriques qui nous intéressent, telles que la position de son barycentre et son ellipticité, sont ensuite extraites de cette image à l'aide de la fonction « regionprops ».

Analyse du mouvement de la membrane

Dans le cadre de l'activation locale de RhoGTPases, je me suis également intéressé à des détails plus fins et plus locaux que le contour global de la cellule. Il faut par exemple trouver un moyen de représenter l'activité locale du mouvement d'une membrane sans avoir à regarder un film tout entier, comme nous l'avons vu précédemment (Figure 2-16) avec la réalisation de kymographes. Plus précisément, il s'agit de quantifier la valeur des pixels le long d'une ligne passant par une zone d'intérêt. Ces kymographes mettent en avant la localisation du front de la membrane, au cours du temps, à partir d'images de fluorescence (Figure 3-7, c) par exemple.

Il est alors possible de déterminer des vitesses de protrusion et de rétraction grâce aux données de distance et de temps extraites de ces kymographes, comme nous le réutiliserons par la suite. De plus, cette méthode, appliquée à une image DIC, met en évidence les corrélations temporelles entre les événements de rétraction de la membrane et l'épaississement de celle-ci (flèches noires, Figure 3-7, b).

La méthode des kymographes offre une bonne visualisation des mouvements membranaires au cours du temps et donne accès à ses vitesses de propagation. Cependant, toute l'activité de la membrane ne se réduit pas à ces protrusions et ne peut être comprise uniquement le long d'une dimension.

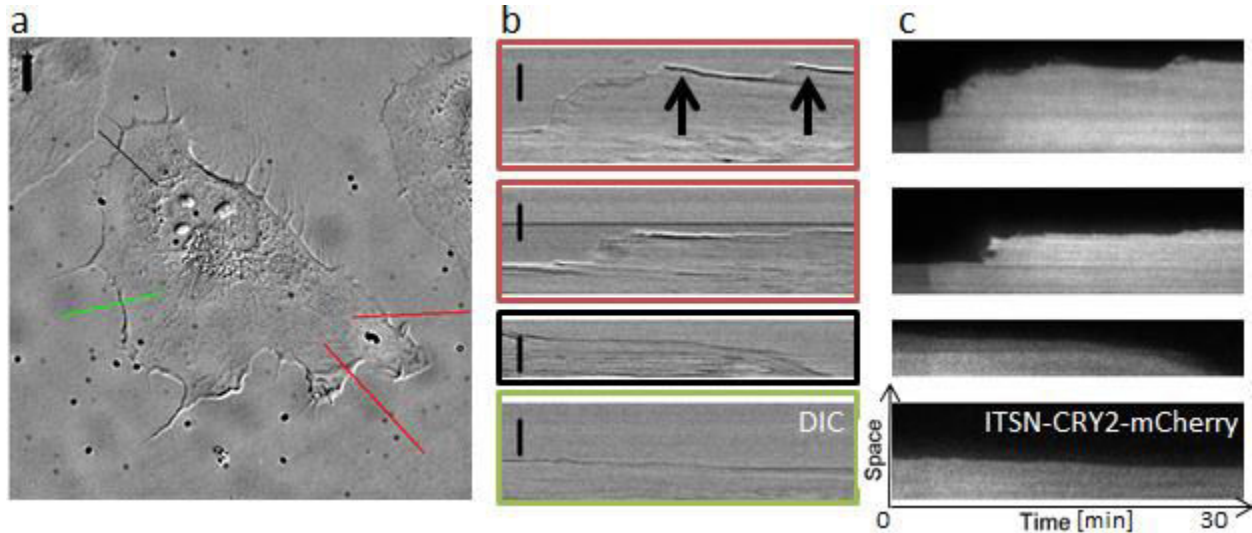


Figure 3-7 : Exemples de kymographes. (a) Première image d'un film d'une cellule HeLa. (b, c) L'axe horizontal est le temps, le film total est d'une durée de 33 minutes. (b) Kymographes effectués à partir du film DIC selon les quatre lignes présentées en (a) Les deux flèches noires soulignent deux événements de rétraction de la membrane. (c) Kymographe effectué à partir du film de fluorescence de cette même cellule. (a-c) Bar d'échelle : 10 µm.

En effet, il est difficile avec cette technique de quantifier la présence de structures membranaires précises comme la création de filopode, la création de vague interne de rétraction et la création de vésicules. La manière dont j'ai traité ce problème se base sur l'utilisation de la fonction « edge » présentée précédemment. Cette fonction, à partir des images DIC, permet de retrouver les structures locales importantes de la cellule – car possédant de forts gradients d'indice (Figure 3-8, c).

La représentativité de ces structures par rapport à la taille totale de l'image est alors quantifiable en comptant le nombre de pixel blancs obtenus après analyse. En considérant que la représentativité de ces structures est une mesure de l'activité cellulaire, il est possible d'utiliser ces valeurs pour comparer l'activité de différentes régions. La validité de ces mesures augmente lorsqu'elles sont corrigées par la surface membranaire et représente alors une densité d'activité de membrane au cours du temps. Par exemple, l'activité de membrane (Figure 3-8, d) dans la région noire diminue alors que la densité d'activité dans cette même région noire ne varie pas (Figure 3-8, e), il n'est donc pas possible de conclure quant à l'augmentation de l'activité dans cette région. En revanche, ces deux mesures augmentent pour la région rouge 125 secondes après le début du film, ce qui indique une réelle augmentation de l'activité cellulaire dans cette région.

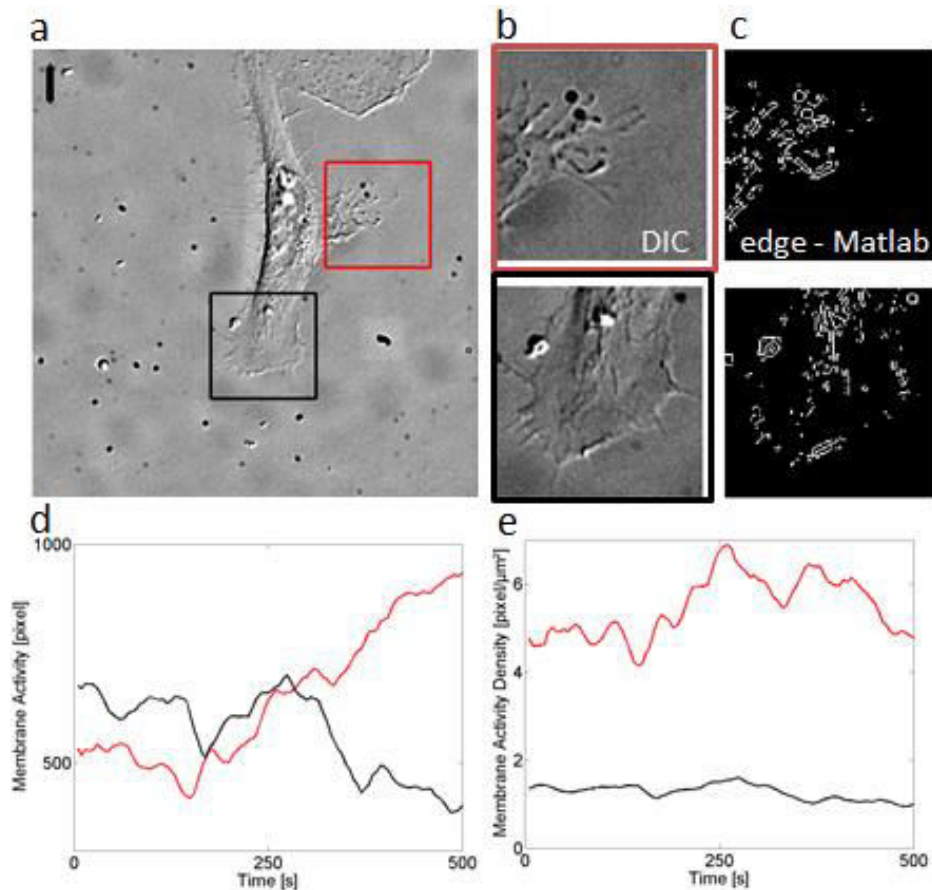


Figure 3-8 : Quantification de l'activité locale de membrane. (a) Image DIC d'une cellule HeLa. Le carré rouge et le noir indiquent la région où est quantifiée l'activité membranaire. Barre d'échelle : 10 μm . (b) Zoom sur les deux régions utilisées pour l'analyse. Les résultats de l'analyse sont les deux images binaires présentées en (c). Le nombre de pixels blancs dans les images analysées au cours du temps est présenté en (d) et sa normalisation par l'aire de la cellule dans la région considérée est représentée en (e).

Segmentation de points focaux d'adhésion

La détermination des caractéristiques du contour d'une cellule et de l'activité de membrane ont nécessité deux analyses différentes, du fait des hypothèses effectuées. Dans le premier cas, nous cherchons une structure très grande et homogène alors que dans le deuxième, nous quantifions des structures beaucoup plus petites et locales, mais aucune hypothèse de forme, ni de structure n'est présupposée.

Ces méthodes sont améliorées lorsque nous connaissons davantage de propriétés des éléments à détecter. Par exemple, les points focaux d'adhésions sont des structures de taille caractéristique entre 0 et 5 μm^2 , dont la forme caractéristique est comprise entre un disque et une ellipse très allongée. La connaissance de ces propriétés permet d'améliorer nos analyses et de retirer tous les éléments qui ne correspondent pas à ces structures.

Il est possible de modifier les images dans leur domaine de Fourier afin de retirer toutes les longueurs d'ondes spatiales qui ne correspondent pas aux caractéristiques de l'objet

recherché. Par exemple, retirer les points ne possédant pas de corrélation spatiale à un pixel de distance supprime du bruit blanc de l'image. En amplifiant les valeurs correspondantes à des structures espacées de quelques micromètres - trois à dix pixels - nous amplifions le contraste pour deux points focaux proches spatialement. Le résultat de cette technique est une amélioration de la segmentation des points focaux (Figure 3-9, c, d).

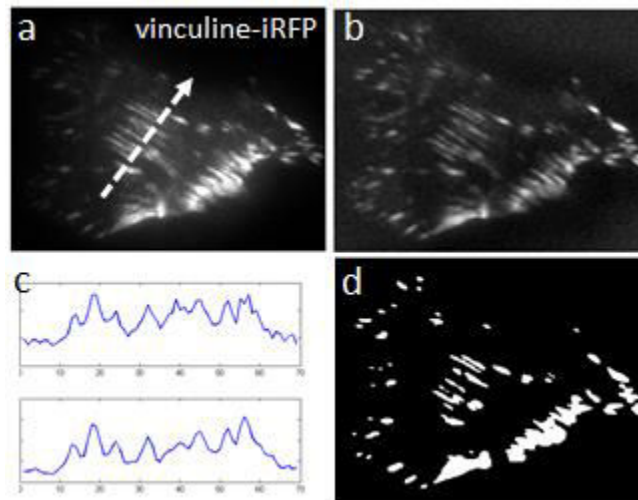


Figure 3-9 : Exemple de segmentation de points focaux. (a) Signal TIRF associé à la protéine vinculine-iRFP exprimée par une cellule HeLa. (b) Image obtenue après un lissage des niveaux de fluorescence par un filtre gaussien et un filtrage dans le domaine de Fourier. (c) Quantification de la fluorescence le long de la flèche blanche pour l'image (a)(haut) et l'image (b)(bas). L'image (d) présente le résultat concernant la segmentation de ces points focaux d'adhésion. (a, b, d) Hauteur des images : 72 μm

Les différentes techniques d'analyse d'image que nous venons de présenter ont été utilisées tout au long de ma thèse pour extraire l'information des films ainsi que pour présenter sur papier certains des éléments dynamiques les constituant.

3.2.2 Recrutement local de Tiam1

Nous venons de voir que Tiam1, recrutée à la membrane, active localement la réserve endogène de RhoGTPases Rac1 en moins de 10 secondes. Nous allons montrer que sur des échelles temporelles plus longues, ce recrutement génère des changements morphologiques à la membrane. Les résultats présentés dans ce paragraphes sont extraits d'un film, mais tous les films réalisés (N>10) nous présentent les mêmes éléments.

En analysant l'activité membranaire dans la région de recrutement de Tiam1, nous observons qu'elle augmente moins de 50 secondes après le début des illuminations (Figure 3-10, c), ce qui est en accord avec l'effet de Rac1 dans les cellules : généré des protrusions à partir de l'activation de la voie de signalisation Arp2/3 (49)(68). Dans cette expérience, les kymographes indiquent la formation d'une protrusion possédant une vitesse de 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (encadré rouge, image TIRF, Figure 3-10, b). Cette première étape de protrusion dure environ 4 minutes et diminue en intensité pour se stabiliser à une vitesse moyenne de l'ordre de 0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$ sur les 15 minutes suivantes. Le kymographe des images DIC de ce film montre que cette avancée de membrane n'est pas continue (encadré rouge, image DIC, Figure 3-10, b). Les traces lumineuses sur ce kymographe nous indiquent que cette protrusion membranaire est constituée d'une succession de phases de protrusion et de rétraction possédant une dynamique beaucoup plus rapide.

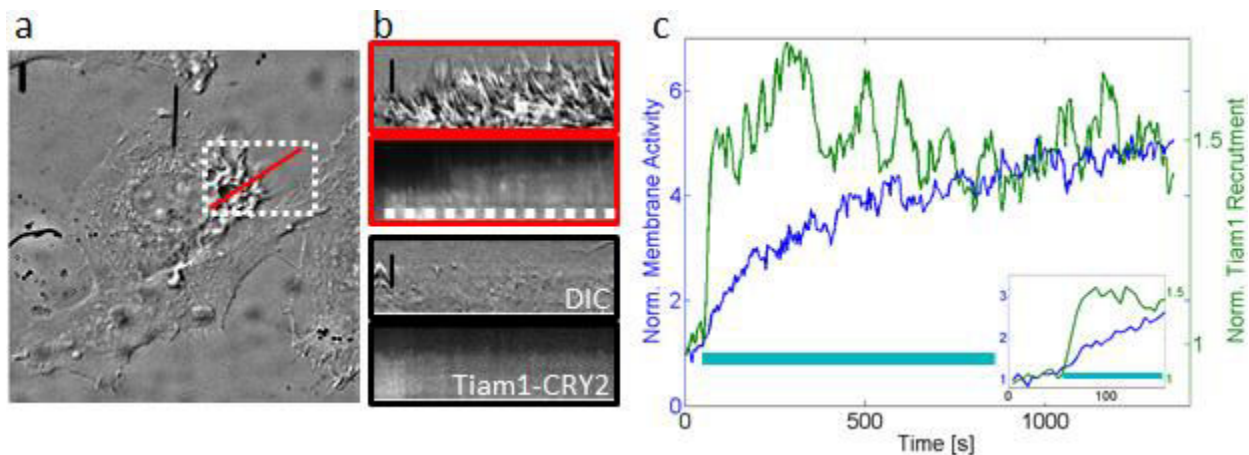


Figure 3-10 : Quantification de l'activité de membrane lors d'un recrutement de Tiam1. (a) Image DIC d'une cellule HeLa transfectée avec Tiam1 et CIBN. La région carrée en pointillés blancs représente la région d'activation de période 25 secondes. La ligne rouge et la ligne noire représentent les lignes selon lesquelles les kymographes de (b) sont effectués. Ces kymographes sont réalisés sur les films des images DIC ainsi que sur les images TIRF mCherry permettant de quantifier la quantité de Tiam1 à la membrane. (c) Graphe représentant en vert la quantité de Tiam1 à la membrane et en bleu l'activité membranaire quantifiés dans la région de recrutement. Le mini graphe inclus dans le graphe (c) est un zoom au temps court du graphe (c). Les lignes bleus et en pointillés blancs (b-c) représentent la période pendant laquelle la cellule a été soumise à des pulse de lumière bleue. Barres d'échelle : 10 μm . Durée des films représentés en (b) : 20 minutes avec une image toutes les 5 secondes.

Le détail de la dynamique d'une de ces protrusion est présenté sur la Figure 3-11. Au départ, un front uniforme de membrane se forme et croît dans la direction perpendiculaire au bord de la cellule. Lorsque la croissance de cette protrusion s'arrête, les bords s'épaississent, se rejoignent et se rétractent. La quantification de ce phénomène de protrusion/rétraction sur une durée de 400 secondes (Figure 3-11, e) valide ce qui avait été supposé lors du tracé des kymographes de la Figure 3-10 et observé en regardant le film. Il existe bien différentes phases successives de protrusion/rétraction.

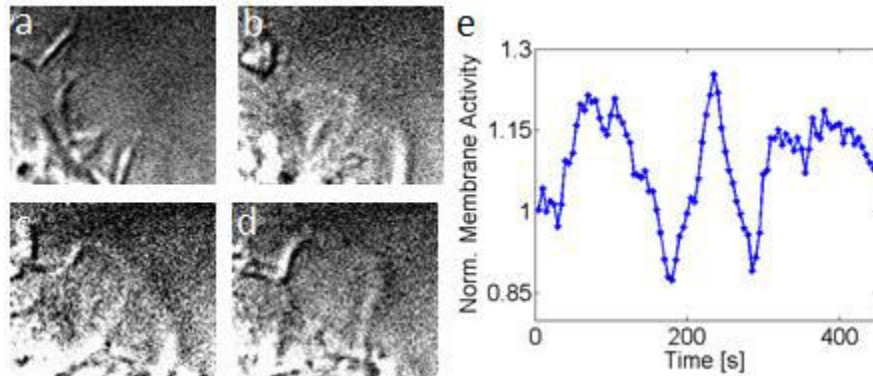


Figure 3-11 : Dynamique d'une protrusion de membrane dans une zone de recrutement de Tiam1. (a-d) Images DIC extraites d'un zoom sur la formation d'une protrusion de membrane. De (a) à (d), $t=0s$, $t=15s$, $t=3s$ et $t=45s$. Hauteur des images : $20\ \mu m$. (e) Quantification dans cette région de l'activité de membrane au cours du temps sur 7 minutes. Les grandes valeurs d'activité correspondent aux événements de rétraction de la membrane.

Le dernier élément observé dans ce film est la formation de macro vésicules de tailles comprises entre 2 et $10\ \mu m$ de diamètre. Ces vésicules peuvent avoir pour origine un repliement de la membrane sur elle-même, ce qui crée une poche de milieu externe qui sous l'action de la tension de membrane et d'éventuels acteurs moléculaires génère ces vésicules rondes.

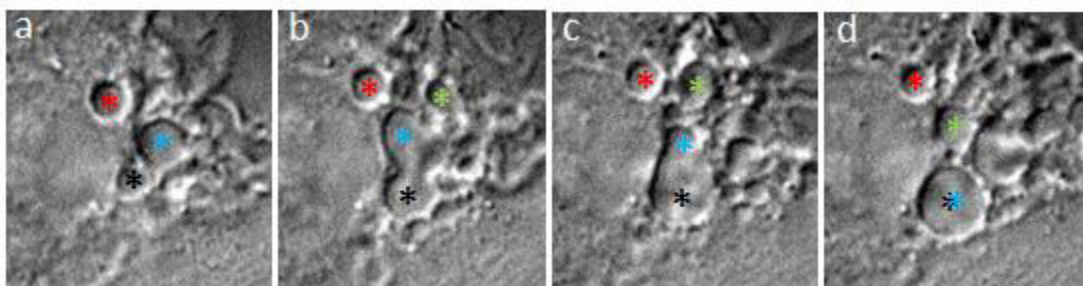


Figure 3-12 : Formation locale de vésicules lors de l'activation de Tiam1. (a-d) Images DIC d'un zoom sur la cellule de la Figure 3-10. Les images sont espacées de 1 minute et 30 secondes. Les astérisques de couleur indiquent au cours du temps la localisation de quatre vésicules différentes. Hauteur des images : $30\ \mu m$.

Toutes les descriptions de l'activation locale de Rac1 concernent des phénomènes locaux, cependant, ces activations ont des conséquences sur le phénotype des cellules à plus grande échelle. Le kymographe de la ligne noire (encadré noir, Figure 3-10, b), en dehors de la zone d'illumination, montre une diminution de l'activité et une rétraction de la membrane au cours du temps. La comparaison de la position de cette cellule entre le début du film et après 20

minutes d'activations locales (Figure 3-13) indique que son barycentre s'est déplacé et que la membrane à l'opposé de la région d'activation s'est rétractée.

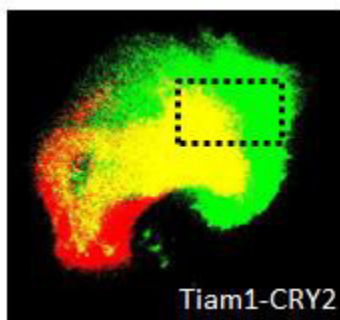


Figure 3-13 : Déformation globale de la cellule lors d'une activation locale de Rac1. En rouge, contour initial de la cellule de la Figure 3-10. En vert localisation finale de cette cellule après 20 minutes d'illumination ($T=25s$) dans la région carrée en pointillés noirs. Hauteur de l'image : $95\ \mu m$.

3.2.3 Recrutement local de Intersectin

L'activation locale de Rac1 crée des structures cellulaires locales mais génère également un changement morphologique sur une échelle spatiale plus grande. Dans ce paragraphe, nous regardons s'il en est de même lors de l'activation de Cdc42. Les résultats présentés ici sont basées sur trois films, mais les mêmes phénomènes ont été observés sur un plus grand nombre de cellules ($N>40$).

La première observation qui nous intéresse est de savoir quel est le comportement de la membrane lors du recrutement local de ITSN. Les chercheurs qui ont publié pour la première fois ce type d'expérience (69) n'ayant pas évoqué de mouvement de membrane, nous nous attendons à ce que l'activation locale de Cdc42 ne soit pas suffisante pour créer un changement local de morphologie.

Dans nos expériences, le recrutement de ITSN à la membrane (Figure 3-14, a, b, c) entraîne la création d'activité membranaire en l'espace de 1 à 2 minutes (Figure 3-14, e). Comme dans le cas de Tiam1, nous observons sur les images DIC des vagues de protrusion et de rétraction et la formation de vésicules à l'intérieur de la cellule de taille comprise entre 2 et $10\ \mu m$ de diamètre.

Des différences avec les observations précédentes existent cependant, comme la formation de types différents filopodes (flèches noires, Figure 3-14). Les premiers sont des filopodes fins qui explorent la lamelle et soit accrochent dessus, soit fusionnent avec la membrane. Les deuxièmes observés semblent être poussés par et canaliser en même temps une protrusion de membrane. Le devenir de ce deuxième type est le même que le premier type, s'accrocher ou être réintégré dans la membrane. L'observation de filopode dans le cas de l'activation de Cdc42 n'est pas étonnant, ce sont par exemples les structures majeures qui ressortent lors d'une surexpression de Cdc42 (Figure 1-14).

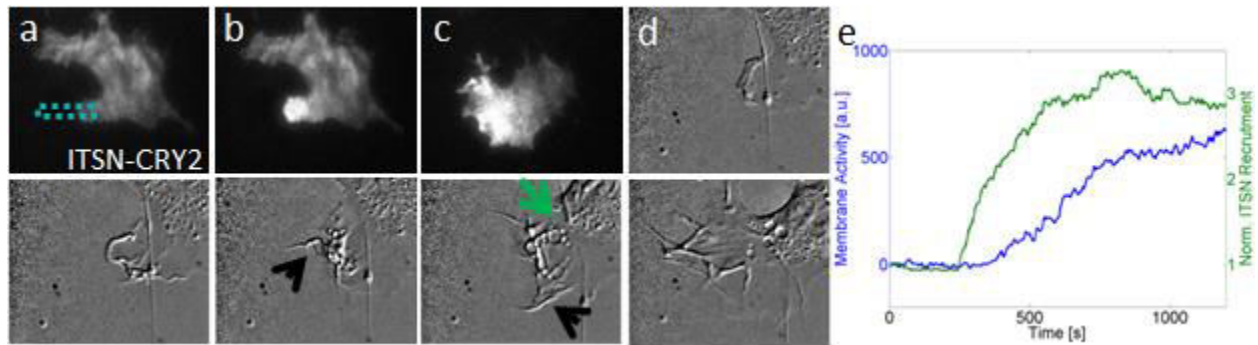


Figure 3-14 : Effets locaux d'un recrutement de ITSN. (a-c) Signal TIRF de ITSN-CRY2 avant (a), juste après (b) et 50 minutes après (c) le début des activations de période 25 secondes. Hauteur des images : 90 μm . La région d'activation est représentée en pointillés bleus. (d) Zoom sur la région d'activation. Images DIC 4, 8, 20, 30 et 50 minutes après le début des activations. Flèches noires, filopodes d'intérêt. Flèche verte, présence de vésicules. Hauteur des images : 55 μm . (e) Quantification du recrutement de ITSN CRY2 en vert et de l'activité de membrane en bleu dans la région d'activation.

Concernant la protrusion de membrane perpendiculaire à la membrane préexistante, nous notons, dans une partie des cas, la même dynamique pour ITSN que celle observée dans le cas de Tiam1. Cependant, un autre type de protrusion de membrane se forme parfois (Figure 3-15, a) en s'appuyant de chaque côté sur des filopodes préexistants. Si, par ailleurs, ces filopodes sont accrochés sur la lamelle, alors la protrusion ne se rétractera pas.

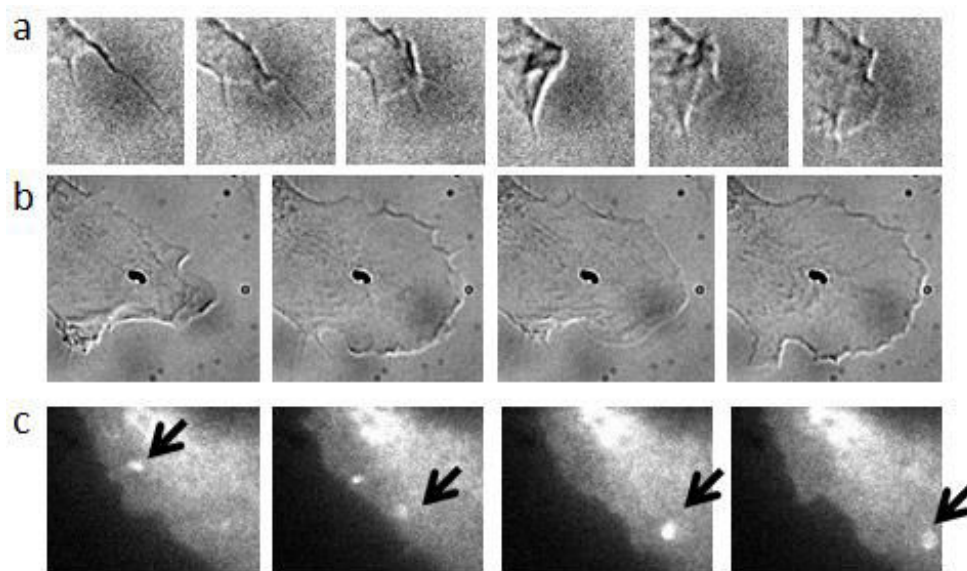


Figure 3-15 : Structures créées par un recrutement local de ITSN. (a) Séquence d'images DIC correspondant à la protrusion d'un lamellipode à partir de deux filopodes. Images séparées de 30 secondes. Hauteur des images : 20 μm . (b) Séquence d'image DIC correspondant à la protrusion d'un large lamellipode. Images espacées de 2 minutes. Hauteur des images : 45 μm . (c) Image de fluorescence de ITSN. Nous observons le déplacement au cours du temps d'une vésicule (flèche noire) enrichie en ITSN. Images séparées de 30 secondes. Hauteurs des images : 45 μm .

Nous avons observé la formation d'un troisième type de protrusion, un large lamellipode plat sans aucun de filopode (Figure 3-15, b). La dynamique de cette membrane a été déterminée dans le cas des kymographes de la Figure 3-7. A partir de cette figure, deux vitesses

de protrusion apparaissent, une vitesse initiale rapide de l'ordre de 11 $\mu\text{m}/\text{min}$ pendant 1 minute, sans phase de rétraction et une suivante plus lente de l'ordre de 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$, entrecoupée de phases de rétraction de vitesse 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Lors de l'activation locale de Cdc42, nous avons vu la formation de petites vésicules internes de diamètre inférieur à 2 μm . Ces vésicules possédaient un mouvement dirigé sur des distances supérieures à la dizaine de micromètres. Une explication probable de ce phénomène est qu'elles résultent d'un processus d'endocytose et sont ainsi recouvertes de CIBN ainsi que de RhoGTPases inactives. Quand ITSN est recruté à leur surface, les RhoGTPases présentes sont activées et de l'actine branchée est polymérisée de manière isotrope. Dès lors qu'une brisure de symétrie est créée, cela propulse ces vésicules comme dans le cas des comètes d'actine, décrites dans l'article (89), créées par un recrutement de Arp2/3 à la membrane. Dans nos expériences, ces vésicules sont déplacées à une vitesse de l'ordre de 4 $\mu\text{m}/\text{min}$ $\pm$ 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ et continuent d'avancer pendant encore environ 3 minutes après avoir quitté la zone d'activation, ce qui correspond au temps nécessaire aux complexes CRY2-CIBN pour se dissocier.

Comme dans le cas de Rac1, les activations locales de Cdc42, maintenues sur des durées d'une vingtaine de minutes, créent un mouvement global de la cellule, mouvement que nous détaillerons dans la suite de cette thèse.

3.2.4 Recrutement local de ArhGEF11

Nous avons vu précédemment que le plasmide ARH-CRY2 active localement RhoA. Contrairement à l'activation de Rac1 et de Cdc42, un recrutement local de ARH-CRY2 ne crée pas d'activité membranaire après 1 à 2 minutes. La membrane commence cependant à se rétracter après une dizaine de minutes de recrutement continu (Figure 3-16). Dans un premier temps, son aspect change pour devenir plus granuleux. Cette contraction de la cellule est suivie de sa rétraction, à une vitesse de 0,1 à 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$, ce qui laisse sur la lamelle des fibres de rétraction, comme dans le cas de la migration spontanée (90). Cette rétraction des cellules correspond au phénotype attendu quant à l'activation des voies de signalisations formines et myosines associées à RhoA, comme nous le verrons dans le Chapitre 4.

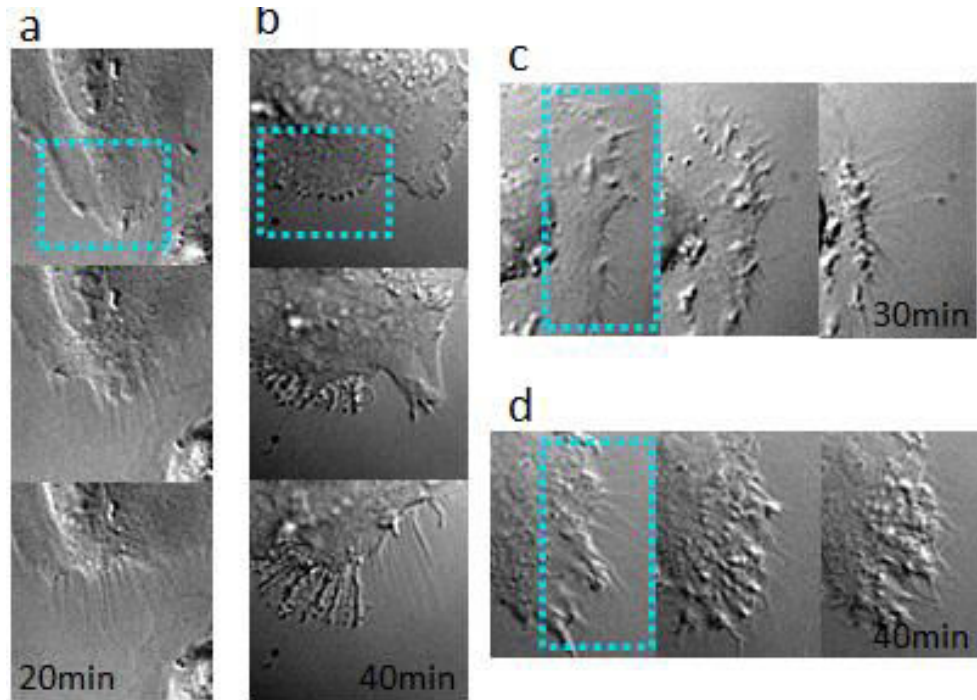


Figure 3-16 : Effet d'un recrutement local de ARH. (a-d) Images DIC de quatre séquences de rétractions pour des cellules photoactivées dans la région bleue (1 pulse de lumière toute les 20s). Hauteur des images (a, b) 42 μm , (c,d) 40 μm .

Au cours de ces expériences, nous n'avons pas observé la formation d'autres types de structures locales. Cependant, ce recrutement local de ARH génère des modifications à longue distance. Il entraîne, en effet, deux types de comportements : des protrusions plates, remarquables à la difficulté de les détourner correctement (ligne noire, Figure 3-17, a, b) et des protrusions actives et volumineuses (flèches noires, Figure 3-17, c, d).

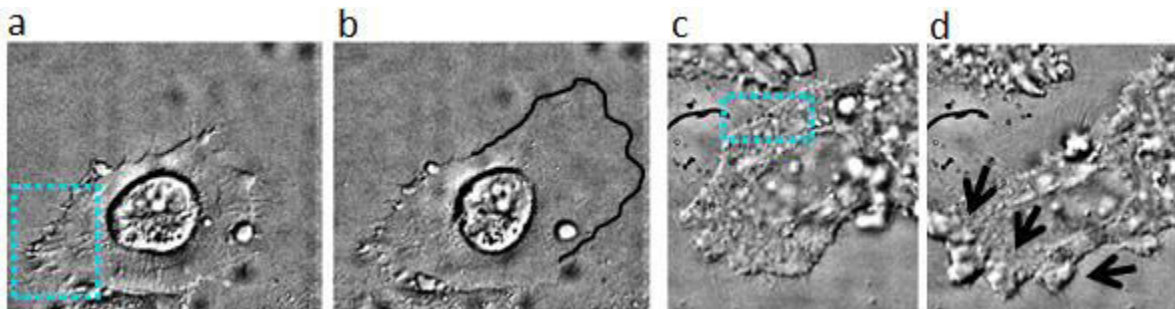


Figure 3-17 : Effet global d'un recrutement local de ARH. (a-d) Images DIC de cellules activées dans la région bleue. (a, b) Image avant (a) et 20 minutes après (b) le début des activations. En noir est mis en avant le contour de la protrusion formée. (c, d) Image avant (c) et 40 minutes après (d) le début des activations. Les flèches noires indiquent trois structures très actives. (a-d) Hauteur des images : 90 μm .

3.3 Intégration globale de la perturbation

Nous venons de voir l'effet local d'une activation de Rac1, Cdc42 et de RhoA sur la création d'activités de membrane, de filopodes, de vésicules ainsi que sur la rétraction. Cependant, il est apparu sur ces films que les modifications phénotypiques locales ont également des conséquences à l'échelle globale de la cellule (Figure 3-14 et Figure 3-17). A partir d'une activation subcellulaire asymétrique de ces RhoGTPases, nous avons observé la création d'une zone protrusive et d'une zone se rétractant. Nous avons donc décidé d'étudier plus en détail cette polarisation globale de la cellule ainsi que la dynamique de déplacement des différents fronts qui se créent lors de ces activations.

Dans le cadre d'activations asymétriques de Cdc42 et de RhoA, nous quantifierons deux éléments simples comme schématisés sur la Figure 3-18. Après avoir défini l'axe de la cellule, à partir du barycentre de la zone de recrutement et de l'autre extrémité de la cellule, nous déterminerons l'évolution de chacune des intersections des bords des cellules avec cet axe. Cela permet de quantifier la dynamique de polarisation avant/arrière de celle-ci ainsi que le déplacement au cours du temps de la membrane. Nous calculerons de plus l'évolution de l'aire à chacune de ses extrémités au cours du temps.

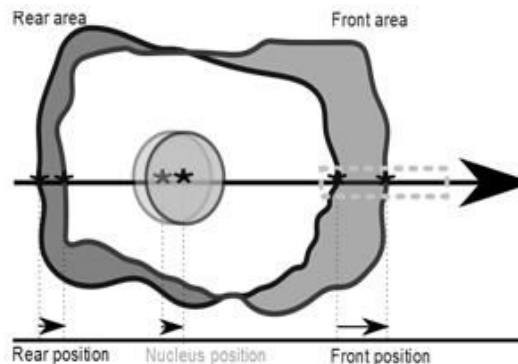


Figure 3-18 : Schéma des éléments quantifiés au cours des expériences. La position de l'avant, de l'arrière et du noyau des cellules sont représentés par rapport à l'axe de polarité (flèche noire). Nous mesurons, de plus, les aires avant et arrière (négative) de la cellule.

3.3.1 Intersectin

Le phénotype observé lors d'une activation locale de Cdc42 est une protrusion qui se forme là où ITSN est recruté. Mais cette protrusion n'est pas toujours soutenue par les mêmes phénotypes, comme nous l'avons vu précédemment. Sur dix-sept cellules observées, quinze ont eu un comportement global comparable. Nous avons en particulier analysé celui de cinq d'entre elles et moyenné ces phénotypes au cours du temps. Pour effectuer le recrutement local de ITSN, la routine d'activation commence 80 secondes après le début de l'expérience par cinq

pulses de lumière espacés de 4 secondes puis est maintenue par un pulse toutes les 20 secondes pendant 30 minutes.

Le contour des cellules au cours du temps montre qu'elles se polarisent systématiquement dans l'axe créé par la localisation de la zone de photoactivation et le point de la cellule le plus éloigné de la perturbation (Figure 3-19, e). Concernant le déroulement de ces changements morphologiques, nous observons que les deux extrémités de la cellule ne se mettent pas en mouvement avec la même dynamique (Figure 3-19, f). En moins de 2 minutes après les premières activations, la membrane dans la zone de recrutement se déplace sur des distances de l'ordre de 5 μm avec une vitesse moyenne de protrusion de 3 $\mu\text{m}/\text{min}$. Au bout d'une dizaine de minutes, la vitesse de l'avant a diminuée jusqu'à atteindre environ 0,35 $\mu\text{m}/\text{min}$ et l'arrière commence à se déplacer dans la même direction que l'avant.

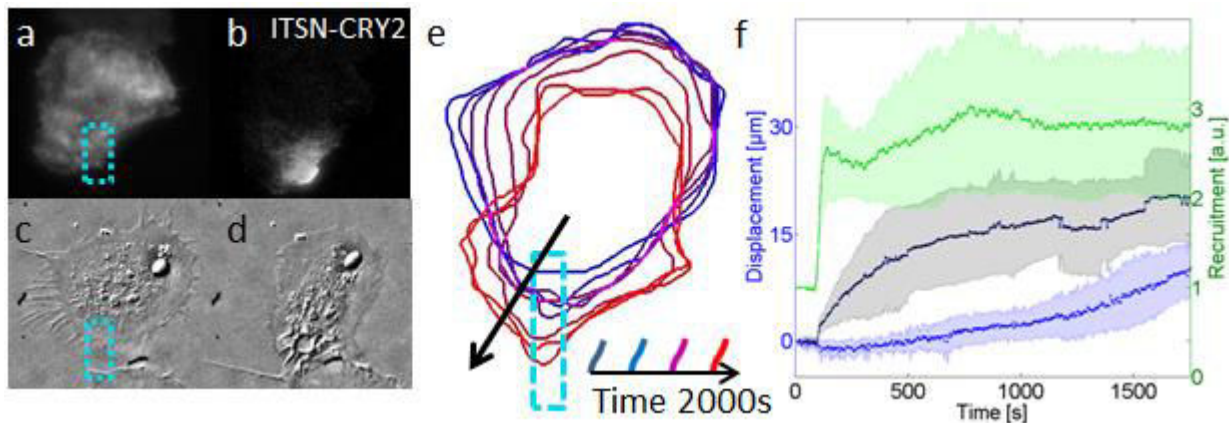


Figure 3-19 : Quantification de la polarisation induite par l'activation locale de Cdc42. Image TIRF et DIC d'une cellule avant (a, c) et après 20 minutes d'exposition de période 20 secondes (b – image différentielle, d). (a-d) Hauteur des images : 100 μm . (e) Segmentation du contour de cette cellule au cours du temps, les profils vont du bleu (début de l'expérience) au rouge (fin de l'expérience). La zone de photoactivation est représentée en pointillés bleus. (f) En vert, quantification au cours du temps de la quantité de protéines ITSN recrutées à la membrane et du déplacement des extrémités de la cellule (f) pour l'avant (en noir) et pour l'arrière (en bleu) de celles-ci. L'avant et l'arrière de la cellule sont déterminés comme présentés dans la Figure 3-18. La transparence indique l'écart type sur ces mesures (N=5).

Les courbes de l'évolution des aires de l'avant et de l'arrière des cellules, en fonction du temps, nous montrent les mêmes éléments : une protrusion rapide à l'avant de la cellule, suivi de son ralentissement et de la rétraction à l'autre extrémité (Figure 3-20, a).

L'explication de ce changement de vitesse de protrusion n'est pas évidente. Une explication à ce phénomène pourrait venir de la comparaison au changement de vitesse lors de l'étalement de cellules fibroblastes (91). Dans ce cas particulier, il a été montré que la cellule protirde rapidement du fait d'une réserve importante de membrane disponible. Cependant, quand les réserves internes diminuent, il est plus difficile de puiser de la membrane pour faire des protrusions, ce qui en ralentit la dynamique.

La représentation de l'aire de la cellule au cours du temps souligne un dernier phénomène : l'augmentation de son aire arrière aux temps courts. Cela s'explique par le recrutement à longue distance de quelques protéines ITSN.

Lors de ces expériences, certaines de ces cellules, cotransfectées avec H2B-iRFP ont permis la caractérisation en parallèle du déplacement du noyau. Ce déplacement possède la même dynamique que l'arrière de la cellule (Figure 3-20, c). Ces résultats et l'observation des films de ces expériences, indiquent que, dans ces conditions, le déplacement du noyau est un phénomène passif et serait contraint par le déplacement de l'arrière de la cellule, contrairement à ce qui est observé dans des fibroblastes (92).

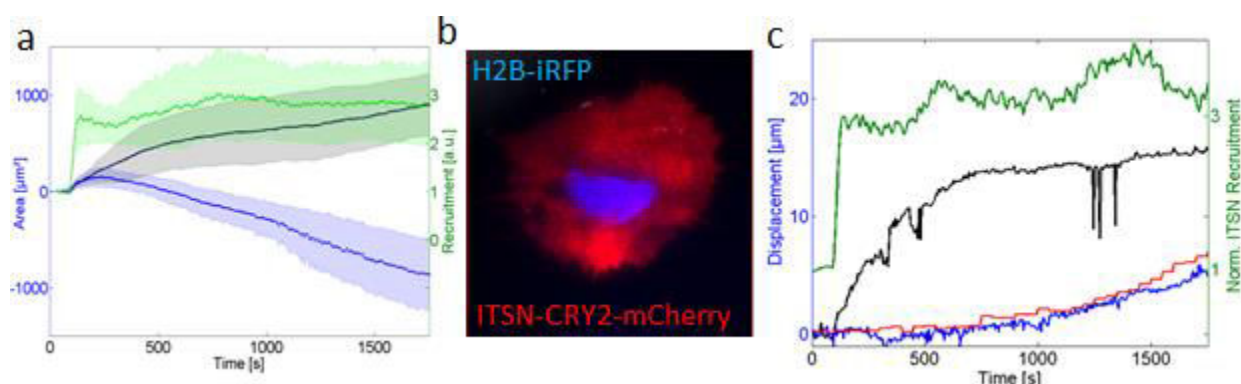


Figure 3-20 : Mouvement cellulaire et mouvement du noyau. (a) Quantification de l'évolution de l'aire avant (noir) et arrière (bleu) de la cellule, pour le même type d'activation que sur la Figure 3-19. (b) Image des signaux du noyau (en bleu) et du recrutement de ITSN (en rouge) d'une de ces cellules. (c) Quantification du déplacement du noyau (en rouge) en fonction du déplacement de l'avant (noir) et de l'arrière (bleu) de la cellule.

3.3.2 ArhGEF11

J'ai réalisé les mêmes expériences sur des cellules exprimant ARH-CRY2-mCherry et CIBN-GFP pour lesquelles le recrutement local de ARH était créé vingt images (soit 80 secondes) après le début de l'expérience avec un pulse de lumière bleue toutes les 20 secondes pendant environ 30 minutes. De nouveau, une large majorité des cellules transfectées a présenté un comportement identique (douze cellules sur les seize quantifiées).

Sur ces expériences, une polarité avant/arrière se dessine clairement et est bien corrélée avec l'axe défini par la zone de recrutement et la zone la plus à l'opposé de celle-ci dans la cellule (Figure 3-21, e). A la différence de ce que nous avons observé avec l'activation de ITSN, et en accord avec les quantifications de nos observations locales, aucune réponse cellulaire n'est observée avant 10 minutes. La rétraction commence à partir d'une quinzaine de minutes après l'activation de RhoA et possède une vitesse de rétraction moyenne de l'ordre de 0,25 μm/min. La comparaison de l'évolution de l'aire à l'avant et de celle à l'arrière montre une forte corrélation : l'avant protrude en même temps que l'arrière se rétracte (Figure 3-21, f).

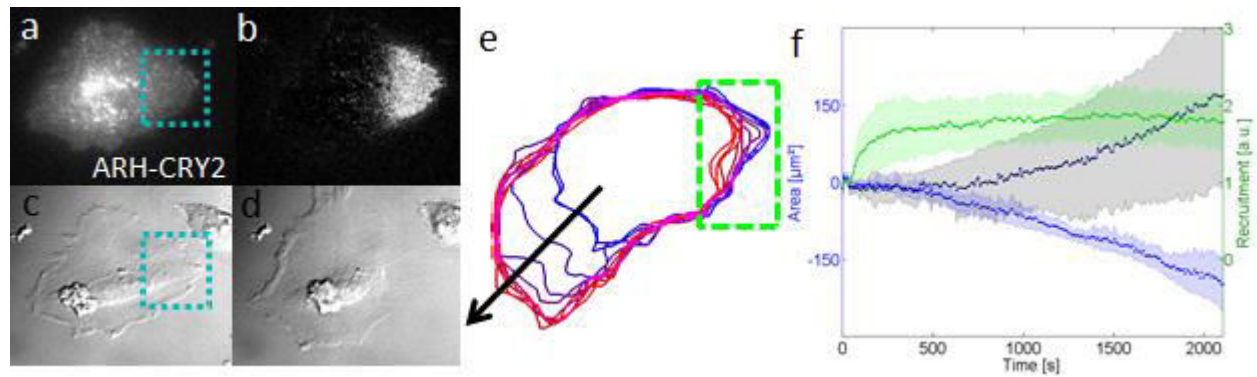


Figure 3-21 : Quantification de la polarisation induite par l'activation locale de RhoA. Image TIRF et DIC d'une cellule avant (a, c) et après (b – image différentielle, d) 20 minutes d'exposition de période 20 secondes. (a-d) Hauteur des images : 92 μm . (e) Segmentation du contour d'une cellule au cours du temps, les profils vont du bleu (début de l'expérience) au rouge (fin de l'expérience). La zone de photoactivation est représentée en pointillés verts. (f) Quantification au cours du temps de la quantité de protéines ARH (en vert) recrutées à la membrane et de l'évolution de l'aire des cellules (f) pour l'avant (en noir) et pour l'arrière (en bleu). Analyse réalisée sur cinq cellules.

A partir des recrutements locaux de ITSN et de ARH, deux types de réponses cellulaires, avec des déroulements temporels différents, ont été mis en avant. Cependant, ces expériences ne nous permettent pas de comprendre comment la cellule répond aussi rapidement à une activation de Cdc42 et à quoi est dû le délai d'une dizaine de minutes pour que l'arrière de la cellule se mette en mouvement. Par la suite, nous aborderons quelques pistes pour expliquer la manière dont les cellules créent leur polarité avant/arrière à chaque extrémité simultanément dans le cas d'une activation de RhoA.

3.4 Inversion de la polarité

Nous venons de voir que l'activation asymétrique de RhoGTPases entraîne la polarisation de cellules ne possédant initialement aucune polarité prédéfinie. Associées à l'observation de marqueurs fluorescents, ces expériences doivent améliorer notre compréhension de la mise en place de l'organisation cellulaire nécessaire à cette polarité. Dans la continuité de ces expériences, nous avons regardé si cette polarisation dépendait de l'état initial dans lequel la cellule se trouve. En couplant notre approche à l'utilisation de micropatron, nous pouvons créer une polarité cellulaire initiale et tenter de la modifier avec un signal optogénétique.

3.4.1 Doubles patrons arbalètes

Une solution simple pour observer des cellules avec une polarisation avant/arrière claire est de les déposer sur des patrons de fibronectine en forme d'arbalète (55). L'idée que j'ai développée est de déposer des cellules sur des patrons arbalètes semblables (de 50 μm de côté) mais se faisant face deux à deux (Figure 3-22, a). Leur taille est choisie de telle sorte qu'une cellule ne puisse s'étaler que sur une seule des arbalètes à la fois et que l'ensemble puisse être visualisé dans le champ de vue de la caméra.

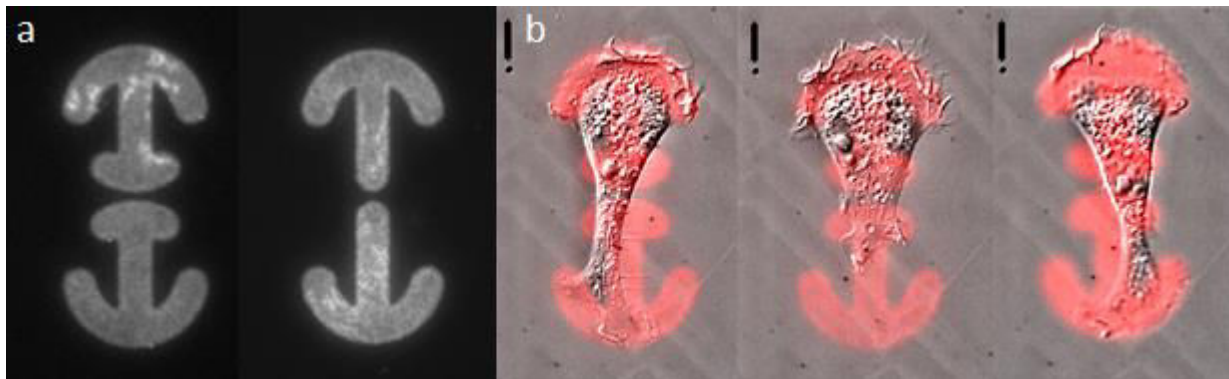


Figure 3-22 : Présentation de la morphologie d'une cellule sur un patron double arbalète. (a) Image TIRF du signal fibrinogène-647 utilisée pour visualiser la présence des patrons de fibronectine. (b) Image DIC d'une cellule sur un patron double arbalète sur laquelle est surimposée l'image des patrons fluorescents. Echantillonnage de trois positions de la cellule à 2h d'intervalle (expériences de 12 heures). Hauteurs des images : 110 μm .

Ces patrons créent ainsi deux positions d'équilibre stable espacées d'une barrière de potentiel qu'il faut franchir pour passer de l'une à l'autre de ces positions. Les cellules HeLa, déposées sur ces patrons, s'étalent alors complètement d'un côté ou de l'autre. Filmées sur plus de 12h consécutives, elles présentent des phénotypes dynamiques. L'avant de la cellule crée un lamellipode très actif et l'arrière forme régulièrement des protrusions sur le second patron (Figure 3-22, b). Nous n'avons cependant jamais observé d'oscillation entre les deux positions d'équilibre (N=25).

3.4.2 Inversion de la polarité avec ITSN

Nous avons reproduit ces expériences avec des cellules transfectées avec ITSN-CRY2 et CIBN en activant localement Cdc42. Dans celles-ci, la région d'activation est modifiée au fur et à mesure pour être toujours localisée sur le bord de la cellule, à l'opposé du lamellipode. Comme observé précédemment, le recrutement de ITSN crée une protrusion dans cette direction (Figure 3-23). En la maintenant sur une durée de 30 minutes, cela force la cellule à continuer de se déplacer dans cette direction et la fait migrer sur le patron initialement inoccupé.

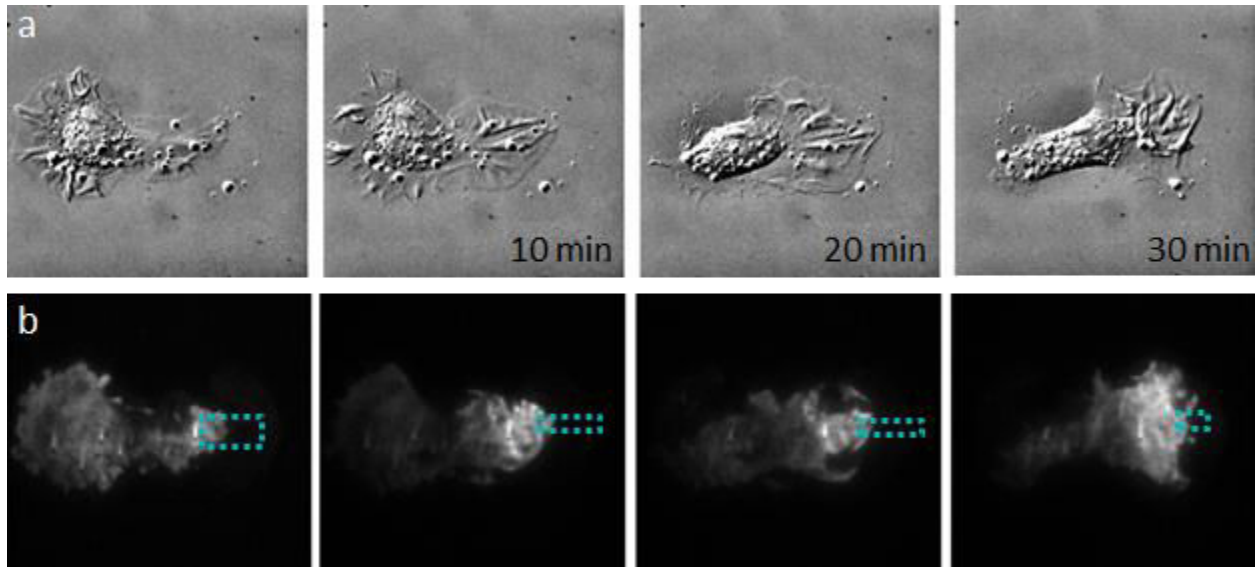


Figure 3-23 : Film de la migration d'une cellule sur double patron arbalète lors d'un recrutement de ITSN. (a) Images DIC d'une cellule. (b) Images TIRF du recrutement de ITSN dans cette même cellule pour une activation toutes les 20 secondes. En bleu est représentée la zone d'activation qui évolue au cours du temps. Hauteur des images : 85 μm

Quand nous arrêtons d'envoyer de la lumière, (Figure 3-24, b), la cellule recouvre une position d'équilibre à cette nouvelle place et y reste. Après une vingtaine de minutes, la réactivation de Cdc42 à l'arrière de cette cellule crée de l'activité de membrane et force à nouveau la cellule à repasser du côté opposé (Figure 3-24, c).

Ces expériences ont déterminé que l'évènement de passage d'un patron à l'autre est un évènement beaucoup trop rare pour qu'une cellule l'effectue naturellement. Cependant, avec les outils d'optogénétique, nous sommes capables de réorganiser la cellule au point que la polarité créée par l'activation des RhoGTPases soit supérieure à la polarité induite par la présence du patron arbalète. Ce système est donc une plateforme intéressante pour étudier en parallèle le maintien et le changement de polarité cellulaire.

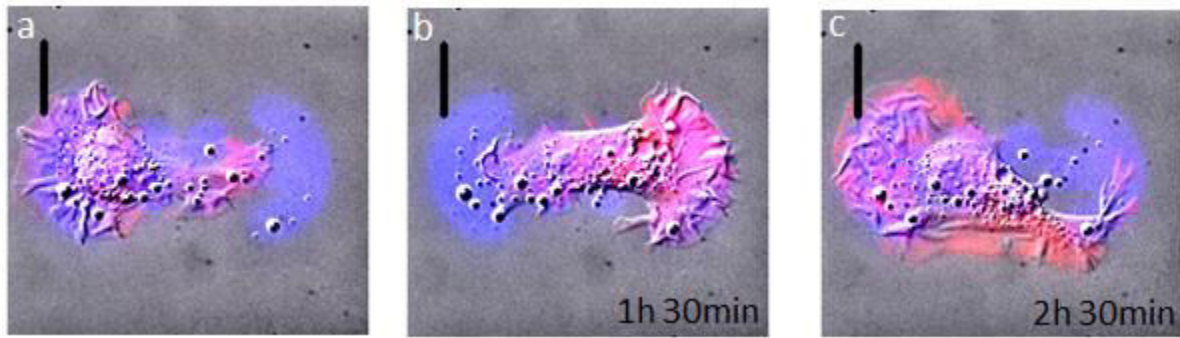


Figure 3-24 : Positions stables d'équilibre de la cellule. Surimpression des images DIC, mCherry (rouge) et fibrinogène-647 (bleu) avant activation (a), après la fin de la première routine d'activation (b) et après la deuxième routine d'activation (c). Barre d'échelle : 20 μm .

3.5 Mécanismes d'intégration globale de la polarité

Nous venons d'observer trois cas où l'activation locale des RhoGTPases, maintenue sur une durée supérieure à la dizaine de minutes, entraîne des modifications globales de la morphologie des cellules. Dans le cas de Cdc42 et de RhoA, la quantification précise du déplacement des cellules laisse à penser que ce ne sont pas les mêmes phénomènes qui interviennent lors de la création de la polarité de la cellule. Cependant, ces expériences ont en commun que la perturbation locale que nous créons est intégrée par la cellule en une réponse globale.

D'après la littérature, plusieurs éléments pourraient expliquer ce que nous observons. Dans la fin de ce Chapitre nous présentons les trois pistes principales explorées : une régulation à longue portée entre RhoGTPases, un effet de la tension de membrane et la conséquence d'un flux interne de cytoplasme.

3.5.1 Régulation des RhoGTPases à longue portée

Il est communément accepté que l'activité locale d'une RhoGTPase est régulée localement par les autres RhoGTPases. D'après la littérature, la présence de Cdc42 pourrait activer localement Rac1 et inhiberait RhoA (Figure 3-25, a) (47). Aucun consensus n'a pourtant été clairement trouvé, comme l'indique l'existence de plus d'une dizaine de modèles (47).

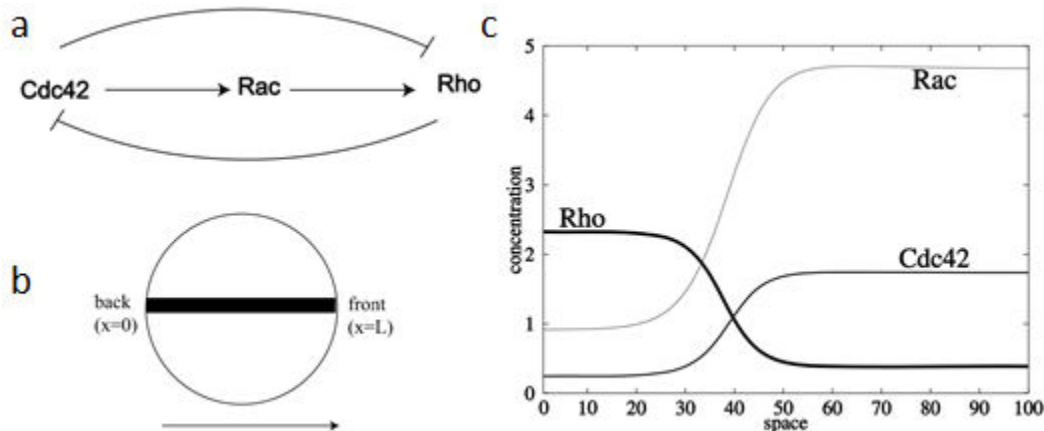


Figure 3-25 : Figure adaptée de (47) présentant un modèle de régulations entre RhoGTPases (a), le système considéré (b) ainsi que le résultat théorique obtenu à partir de ce modèle pour la distribution spatiale théorique des RhoGTPases(c).

Ce type de régulation expliquerait les vagues de protrusion et de rétraction de la membrane ainsi que la polarité globale avant/arrière présentée par les cellules en migration par exemple (47). Cependant ce phénomène d'activation/inhibition locale n'est pas parfaitement compris au niveau moléculaire (93).

En considérant, comme postulat de base, que les RhoGTPases régulent leurs activités réciproques localement, en activer une localement modifie à longue distance l'activité des

autres. Si Cdc42, par exemple, a la capacité d'inhiber localement RhoA et que, au cours du temps, le nombre de protéines Cdc42 actives est gardé constant, alors par un simple effet de balance, le nombre de RhoA actives à l'autre extrémité devrait augmenter.

C'est le type de raisonnement que font les auteurs de l'article (47). En prenant comme base le modèle de la Figure 3-25, (a), ils déterminent numériquement la répartition finale de RhoA, Rac1 et Cdc42. Certaines analyses de ces auteurs reproduisent alors la polarité avant/arrière, concernant la répartition des RhoGTPases observée pour des cellules en migration (Figure 3-25, c).

Pour tester la validité de ces idées dans notre modèle, j'ai transfecté des cellules simultanément avec les plasmides CIBN-GFP, ITSN-CRY2-mCherry et RBD-iRFP. Lorsque nous créons une activation locale de Cdc42 sur des durées de l'ordre de la dizaine de minute, ni diminution locale, ni augmentation à longue distance du rapporteur d'activité de RhoA ne sont observées. Le même type d'expérience mené sur des cellules où j'activais localement RhoA et regardais le signal PAK1 n'a pas permis d'observer, ni à courte, ni à longue échelle, de localisation spécifique de PBD-iRFP. D'après ces expériences, avec la résolution associée aux sondes iRFP de l'activité des RhoGTPases, il semble donc qu'il n'y ait pas d'interaction directe entre RhoA, Rac1 et Cdc42.

3.5.2 Tension de membrane

Certaines expériences ne sont pas explicables par ce type de régulation. C'est le cas, par exemple, de l'augmentation de la tension de membrane, dans un neutrophile initialement polarisé, qui génère instantanément une réorganisation de l'activité Rac1 de la cellule (Figure 3-26)(94).

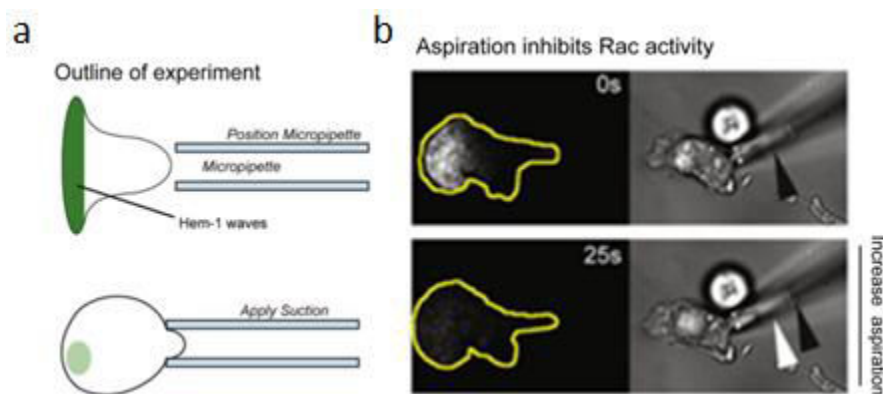


Figure 3-26 : Changer la tension de membrane modifie l'activité des RhoGTPases. (a) Schéma de principe de l'expérience. Une cellule initialement polarisée et possédant une région avec une forte activité Rac1 (en vert) est soumise à une augmentation de tension, ce qui délocalise Rac1. (b) Images de l'expérience correspondant au schéma (a). Figure adaptée de (94)

Il serait intéressant alors de réfléchir à un autre phénomène qui régulerait l'activité des RhoGTPases et de la membrane à longue portée : la tension de membrane. Cette tension modifierait localement et à grande distance les propriétés physiques de la membrane, ainsi que de son environnement proche. Cela modifierait les affinités d'autres protéines avec la membrane et entraînerait des changements de conformation ainsi que des relocalisations de certaines d'entre elles (95). Les changements locaux et globaux de tension membranaire, ayant pour origine l'activation locale et globale des RhoGTPases, entraîneraient une réorganisation locale et globale d'effecteurs ainsi que de protéines contrôlant l'activité de ces mêmes RhoGTPases elles-mêmes.

Pour tester ces hypothèses, il faudrait refaire les expériences décrites dans ce Chapitre tout en modifiant la tension globale de la membrane. Nous devrions par exemple regarder si un recrutement local de ARH crée toujours une protrusion à longue portée, dans le cas de cellules plongées dans une solution enrichie en sucre - cette solution hypertonique ayant pour effet de diminuer la tension membranaire (94).

3.5.3 Flux de cytosol

Dans le cas d'une activation locale de ARH, un dernier phénomène peut expliquer le phénotype observé. Cette idée se base sur la corrélation temporelle entre la rétraction de l'arrière de la cellule et la protrusion de l'avant (Figure 3-21, f). Si le recrutement de ARH réduit localement le volume de la cellule et s'il y a conservation du volume total de celle-ci, alors le volume cellulaire à l'autre extrémité doit augmenter. C'est l'idée qui a été développée dans l'article (96) où le volume total des cellules en division est considéré constant, tandis que le volume de ses deux extrémités oscille autour d'une moyenne (Figure 3-27) du fait de variations locales de la contractilité.

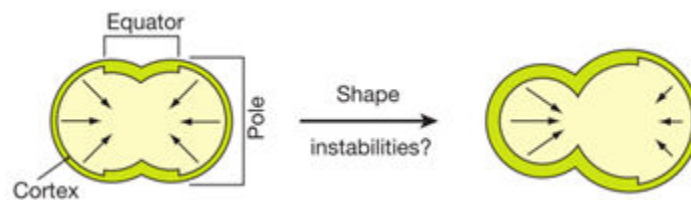


Figure 3-27 : Schéma présentant le principe des observations faites par les auteurs de l'article (96) concernant les oscillations de volumes chez une cellule en division.

Dans le cas de cellules adhérentes, une contraction locale liée à RhoA pourrait créer un flux de cytoplasme qui entraînerait l'augmentation du volume à l'opposé. Cela pourrait alors créer une protrusion qui, si elle s'attache à la lamelle, conduit la cellule à se déplacer. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions par exemple co-injecter des billes suffisamment petites pour être libres dans le cytoplasme (<50 nm) et certaines plus grosses (>100 nm) qui seraient bloquées par le cytosquelette. Il faudrait regarder alors si le mouvement moyen des petites

billes suit le mouvement global de la cellule. Si c'est le cas, cela validerait l'hypothèse stipulant que les modifications membranaires ne sont pas uniquement liées à des effets des RhoGTPases mais aussi à un flux global de cytosol.

3.6 Résumé

Recruter localement les domaines DHPH de Tiam1, Intersectin et ArhGEF11 permet d'activer en moins de 10 secondes les RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA respectivement.

Les recrutements de Tiam1 et ITSN créent de l'activité de membrane là où les RhoGTPases sont activées, sous forme de protrusions/rétractions de membrane et de formation de vésicules en moins de 5 minutes. Les recrutements de ITSN favorisent la formation de filopodes.

L'activation locale de Cdc42 crée une protrusion en moins de 2 minutes puis entraîne le déplacement de l'arrière de la cellule en une quinzaine de minutes, son noyau suivant la dynamique de l'arrière.

L'activation locale de RhoA génère en parallèle une rétraction locale de la membrane et la formation d'une protrusion cellulaire à l'opposé, en une quinzaine de minutes.

Les patrons double-arbalètes forcent une polarisation ne pouvant pas être inversée naturellement par les cellules, mais qui est renversable en activant localement Cdc42 à l'aide de ITSN-CRY2.

Chapitre 4 Dissection moléculaire de l'activation de RhoA

Nous venons de voir qu'il est possible d'utiliser le système CRY2/CIBN pour créer une activation locale des RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA. Ce recrutement, lorsqu'il est maintenu au cours du temps, entraîne une modification globale de l'organisation de la cellule. Nous avons vu, de plus, dans le Chapitre 2, que ce système optogénétique permet de contrôler précisément la quantité de protéines recrutées à la membrane.

Dans ce Chapitre, nous regarderons les détails moléculaires de la réorganisation interne de la cellule. En effet les RhoGTPases n'ont pas une action directe sur l'activité de la membrane, mais agissent par l'intermédiaire d'effecteurs comme nous l'avons présenté dans l'Introduction. Ces éléments ont des rôles particuliers, que ce soit concernant l'interaction avec le substrat, la création des protrusions et la rétraction de la membrane, tous nécessaires à la polarité pendant la migration.

Nous allons nous attacher à comprendre les phénomènes expliquant la contraction d'une cellule. D'après la littérature, cette contraction est directement reliée à la structure du cytosquelette des cellules, à leur capacité à le mettre en tension et à leur adhésion sur la lamelle (14)(22)(23). Nous nous sommes donc intéressés à la distribution des points focaux d'adhésion et à leur évolution temporelle lors de l'activation locale de RhoA. Nous avons ensuite regardé de manière systématique la réponse de cellules à un recrutement local de ARH et avons corrélié l'amplitude de ce signal au cours du temps à la quantité d'actine recrutée. Par ailleurs, nous avons regardé plus précisément les interactions entre filaments d'actine et myosines, pour comprendre les phénomènes à la base de la contraction des cellules ainsi que son déroulement dynamique.

4.1 Dynamique des points focaux

Un des éléments clé dans la compréhension de la manière dont une cellule se réorganise pour se polariser et se déplacer de manière globale sur une lamelle passe par l'observation des contacts créés entre la cellule et la lamelle. Nous avons donc décidé de regarder la localisation et l'évolution des points focaux, au cours d'expériences d'activation de Cdc42 et de RhoA. Cela devrait améliorer notre compréhension de l'interaction directe entre l'activité des RhoGTPases, la quantité et la taille des points focaux, ainsi que le rôle de ces points focaux dans la polarisation globale des cellules.

4.1.1 Intersectin

Pour regarder la dynamique des points focaux, nous avons créé le plasmide Vinculine-iRFP (97). Lors de recrutements de ITSN à la membrane – et donc d'activation de Cdc42-, deux types de protrusions sont observables, s'accompagnant de deux réponses différentes, quant à l'organisation des points focaux.

Le premier type de phénomène correspond aux protrusions décrites dans la Figure 3-14, où nous observons une activité membranaire importante, due à la formation simultanée d'un lamellipode et de filopodes (Figure 4-1, a, b). Dans ce cas, il est notable que les filopodes qui s'accrochent à la lamelle sont fortement enrichis en vinculine. De plus, ce phénotype s'accompagne d'une réorganisation des points focaux entre la cellule et la lamelle (Figure 4-1, c).

Dans le cas de la formation d'une large protrusion plate, qui ne présente pas d'activité de filopode et de rétraction, aucun nouveau point focal n'est observé. Est-ce parce qu'ils ne sont pas visibles à notre résolution, du fait de leur petite taille ? Est-ce qu'ils sont enrichis en une autre protéine d'adhésion que vinculine ? Ou bien est-ce que ces protrusions ne sont pas adhérentes ?

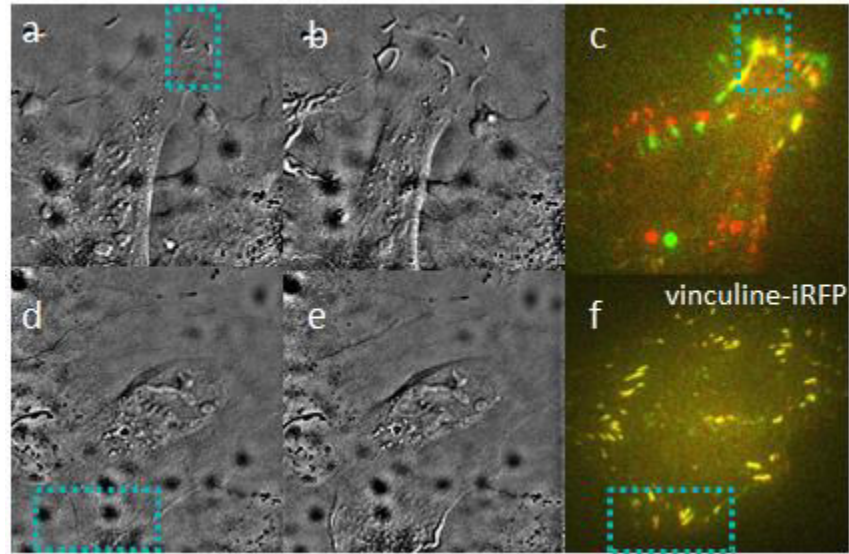


Figure 4-1 : Localisation des points focaux lors d'une activation de Cdc42. (a-c) Cellule HeLa exprimant ITSN-CRY2 et vinculine-iRFP. (a, b) Image DIC avant (a) et après (b) un recrutement local continu dans la zone bleue. (c) Image différentielle TIRF des points focaux d'adhésions, avant (rouge) et après (vert) activation. Hauteur des images : 70 μm . (d-f) Même expérience sur une cellule créant une protrusion (e) mais ne présentant ni filopode, ni la formation de nouveaux points focaux (f). Hauteur des images : 100 μm

4.1.2 ArhGEF11

Dans le cas d'expériences de recrutement local de ARH en présence de vinculine-iRFP, nous observons le même phénotype global que celui décrit précédemment (Figure 4-2) : la zone où RhoA est activée se rétracte et une protrusion se forme à l'autre extrémité de la cellule.

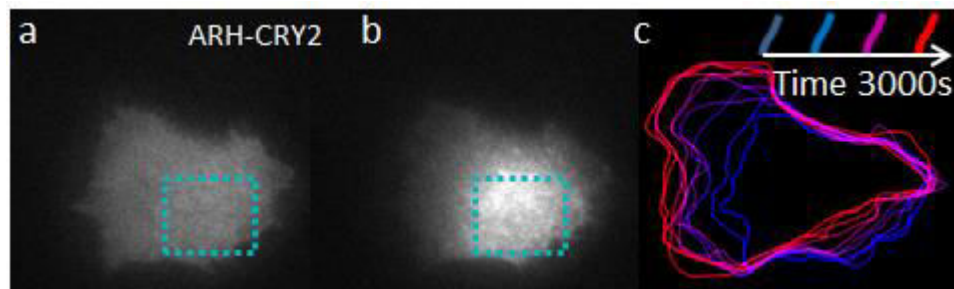


Figure 4-2 : Evolution du contour d'une cellule co-transfectée avec ARH et vinculine-iRFP. Image TIRF de ARH avant (a) et après 5 minutes (b) pour une activation dans le carré bleu. (c) Segmentation du contour de la cellule au cours du temps. Le début de l'expérience est en bleu et la fin correspondant à 50 minutes après les premières activations en rouge. Hauteur des images : 75 μm .

Une observation rapide du signal TIRF de la vinculine iRFP de cette cellule présente deux éléments principaux (Figure 4-3, c). Dans la zone d'activation et à proximité, les points focaux se contractent. En effet leur position initiale (en bleu) est modifiée au cours du temps (du bleu vers le rouge). Ce mouvement est dirigé vers le centre d'activation de RhoA. Ces déplacements seraient liés à la contraction locale générée par l'activation de RhoA. Cette contraction ayant

pour origine la contraction des fibres de stress reliant entre eux ces points focaux, du fait de l'augmentation de l'activité des myosines II.

Il est important de noter que, sur ces expériences d'activation de RhoA, ni enrichissement local en vinculine-iRFP, ni la formation de nouveaux points focaux d'adhésion n'ont été observés dans la région d'activation. Ce qui est en accord avec les derniers résultats obtenus par des chercheurs capables d'activer localement la formine mDia1 (98).

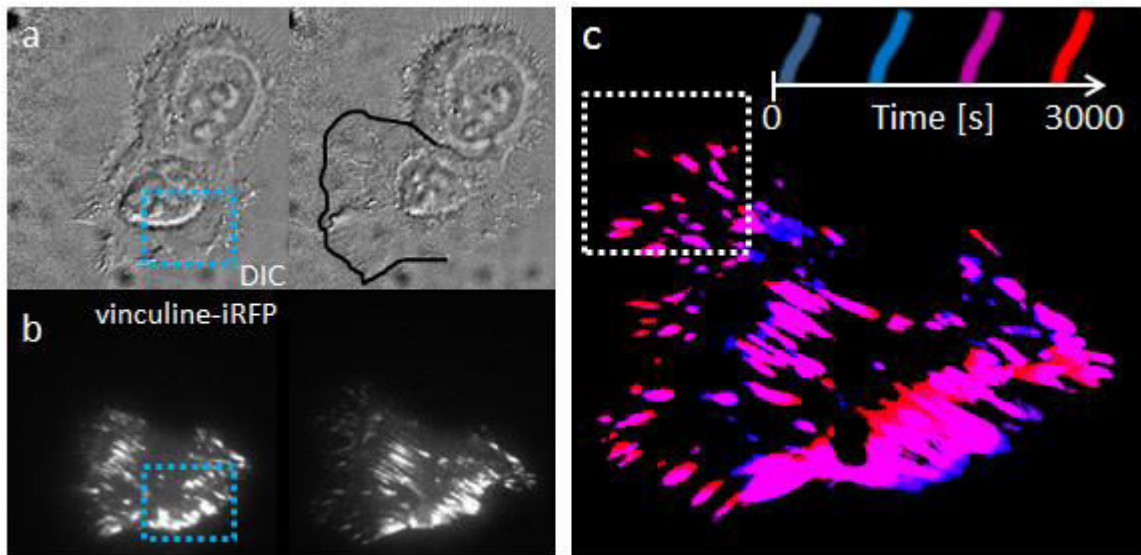


Figure 4-3 : Evolution des adhésions focales lors d'un recrutement de ARH. Images DIC (a) et signal TIRF de vinculine-iRFP (b) avant (gauche) et au cours (droite) d'un recrutement local de ARH dans la zone bleue. (c) Segmentation des points focaux au cours du temps (du bleu vers le rouge). Hauteur des images : 110 μm

Lors de ces activations, nous observons la formation de nouveaux points focaux (en rouge) là où la cellule protrude ce qui amène la question de savoir quel est le mécanisme de formation des protrusions et en particulier quel est le rôle des points focaux. Cependant nous n'avons pas été capables de comprendre la nature passive ou active du phénomène. Est-ce que c'est la membrane qui protrude qui entraîne la création de nouvelles adhésions focales ou bien est-ce la création de nouveaux points focaux qui permet à la membrane de continuer sa progression ?

En regardant la dynamique de ces points focaux, en particulier juste après leur formation (carré blanc, Figure 4-3), nous avons obtenu des indices concernant leur interaction avec le cytosquelette (99). La segmentation précise du signal vinculine-iRFP (Figure 3-9) et l'analyse de leur forme et leur position au cours du temps, indiquent que ces adhésions se déplacent vers la zone d'activation de RhoA (Figure 4-4, a) et que certaines d'entre elles sont de plus en plus étirées au cours du temps (Figure 4-4, b).

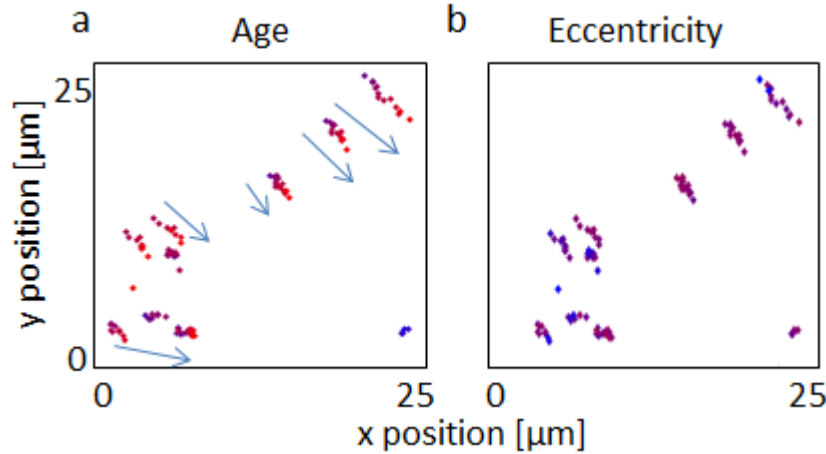


Figure 4-4: Evolution de la position et de la forme de points focaux au cours du temps. Seuls les points focaux présents dans la zone blanche pointillée de la Figure 4-3 sont représentés dans cette figure. (a, b) Les points focaux sont représentés en fonction de la position de leur barycentre au cours du temps. (a) Evolution de leur âge (du bleu vers le rouge – de 0 à 50 minutes) et de leur excentricité (en bleu sont représentés les formes sphériques, en allant vers le rouges, le rapport petit axe de l'ellipse divisé par grand axe tend vers 0).

Il semble donc que la perturbation locale entraîne la création des nouveaux points focaux à longue distance. Ces points focaux, à partir du moment où ils sont intégrés au réseau global de la cellule, sont progressivement tirés vers le centre de la cellule du fait de l'existence de forces internes, en partie régulées par l'action de RhoA (97). J'ai analysé précisément la vitesse de certains de ces points focaux en fonction du temps (Figure 4-5, a, b). Cette vitesse est non nulle dès leur apparition, ce qui signifie que le délai entre création et intégration est très court voire nul si les points focaux sont déjà fixés au cytosquelette lorsqu'ils sont créés.

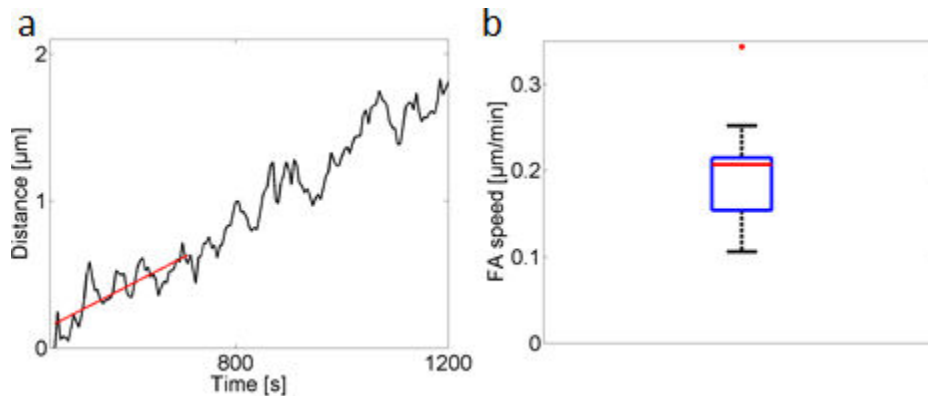


Figure 4-5: Analyse du déplacement au cours du temps de la position du barycentre des points focaux nouvellement créés. (a) Distance (en noir) dont s'est déplacé un point focal par rapport à sa position d'apparition. En rouge, ajustement affine de cette courbe : la pente détermine la vitesse. (b) Moyenne des vitesses initiales des points focaux d'adhésions créés après le début de la l'activation (N=12 points focaux).

4.2 Interaction ARH-actine

D'après ce que nous avons vu dans l'Introduction, les RhoGTPases RhoA, sous leur forme active, interagissent selon deux voies principales impliquées dans la migration cellulaire. Elles sont à l'origine de la polymérisation d'actine à la membrane, par l'interaction et l'activation de formines telles que mDia (90), et contrôlent l'activation des myosines et la contractilité cellulaire, par leur interaction avec la kinase ROCK (44).

Nous allons explorer ici l'importance de RhoA, quant à la polymérisation et la disparition locale d'actine. Avec cette approche, nous modéliserons la dynamique de ces processus de manière simple. Intégrée à l'échelle globale de la cellule, cette démarche locale nous montre l'intérêt de relocaliser de l'actine pour polariser globalement une cellule.

4.2.1 Polymérisation d'actine

Dans le but de comprendre l'évolution de la localisation d'actine au cours du temps lors d'une activation de RhoGTPase, nous avons créé un plasmide de fusion entre iRFP et la protéine Life-Actin (Lifeact) (100), Lifeact étant une protéine se fixant spécifiquement sur les filaments d'actine. En regardant le signal de Lifeact-iRFP, exprimée dans une cellule, des structures de tailles variables, allant du « nuage » trouble de petits filaments, aux fibres de stress de taille supérieure à 10 μm sont observées (Figure 4-6).

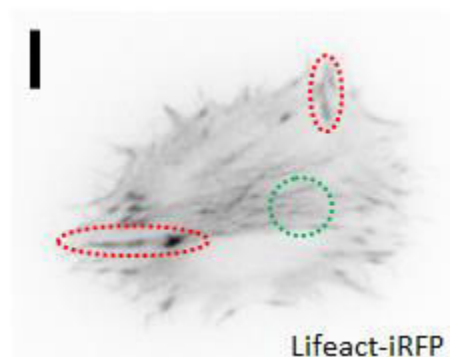


Figure 4-6 : Image TIRF d'un signal Lifeact-iRFP. Deux fibres de stress sont mises en avant par les ellipses rouges. Une zone enrichie en petits filaments d'actine est soulignée par le cercle vert. Barre d'échelle : 10 μm .

Nous garderons à l'esprit le fait que surexprimer Lifeact dans les cellules peut, selon le contexte, biaiser les expériences. En particulier, le temps d'interaction de Lifeact avec l'actine est de l'ordre de la seconde (101), alors que le temps de renouvellement de l'actine est plutôt de l'ordre de la minute dans des cellules HeLa, ce qui signifie que cette protéine convient parfaitement pour regarder des changements de localisations d'actine. En revanche, l'historique d'un filament d'actine n'est pas accessible avec cette protéine, son temps d'interaction avec celui-ci étant trop court.

Les films que nous avons pris tout au long de ce chapitre ont été réalisés à des fréquences comprises entre 0,05 et 1 Hz. En parallèle à l'observation des signaux TIRF mCherry et iRFP nous avons créé des recrutements locaux de ARH avec une périodicité comprise entre 5 et 50 secondes. Lors d'un recrutement local de ARH, une augmentation du signal TIRF de la fluorescence iRFP est observée. Il y a donc un enrichissement en actine filamenteuse à proximité de la membrane Figure 4-7, b). D'après cette expérience, il apparaît de plus que cette quantité diminue loin de la zone d'activation, mais qu'elle est constante sur l'ensemble de la cellule Figure 4-7, c).

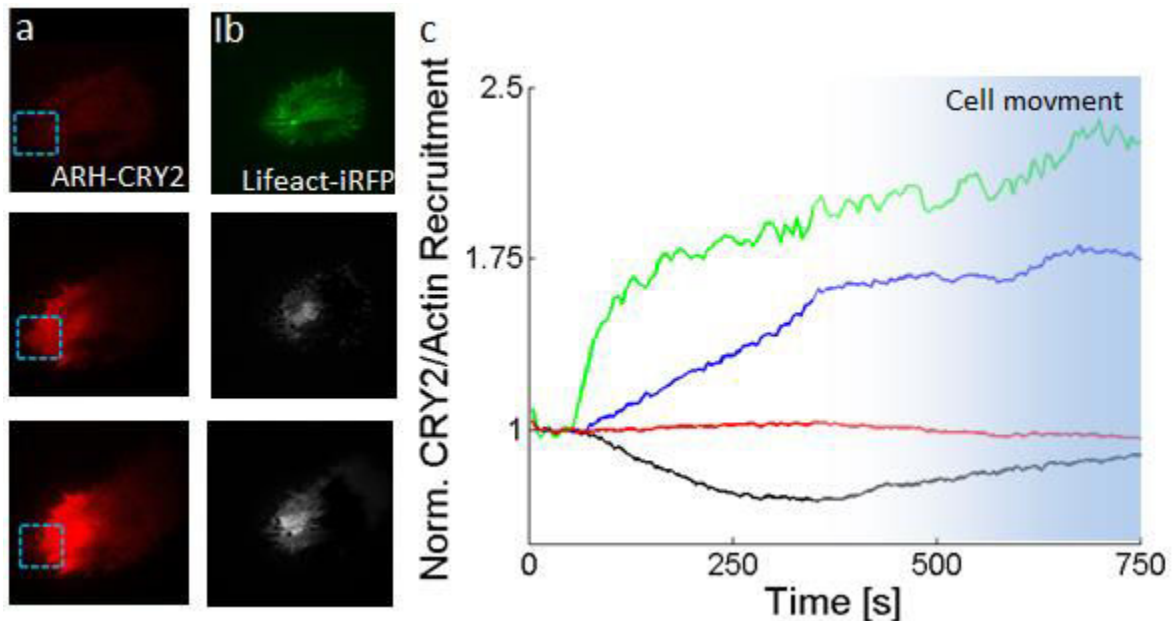


Figure 4-7 : Effet du recrutement de ARH sur l'actine. (a, b) Images TIRF du signal associé à ARH (a) et Lifeact-iRFP (b) avant l'activation (haut), ainsi que 2 minutes (milieu) et 10 minutes (bas) après le début de l'activation. Barre d'échelle : 10 μ m. (c) Quantification du recrutement de ARH (en vert), de Lifeact dans la zone de recrutement (en bleu), de Lifeact dans une zone à l'autre extrémité de la cellule (en noir), et dans toute la cellule (en rouge). Les valeurs sont normalisées par la valeur moyenne des cinq premiers points. En bleu est surimprimé le début du mouvement global de la cellule.

Nous avons vérifié que ces protéines ne viennent pas simplement d'actine filamenteuse, juste au-dessus de la région de TIRF, qui aurait été attirée contre la membrane. En effectuant la même expérience et en regardant la cellule en TIRF ainsi qu'en microscopie inversée classique, nous observons sur les deux images le même phénomène d'enrichissement d'actine. Nous sommes donc en présence de polymérisation d'actine, à partir de monomères, sous l'effet de l'activation de RhoA. La polymérisation observée, ressemblant à un nuage local de petits filaments d'actine, pourrait, en particulier, être due à l'activation à la membrane d'un grand nombre de formines nucléant de nouveaux filaments (90). Cette polymérisation est en accord avec ce qui a récemment été décrit quant à l'effet de mDia1 (98), en revanche, nous ne retrouvons pas ce qui a été décrit quant au rôle mDia2 et de la formation de fibres d'actine (102).

4.2.2 Conditions non saturantes de recrutement

Nous avons vu dans le Chapitre 3 que la quantité de protéines RhoA activées est contrôlable en changeant les caractéristiques d'illumination. Il était alors important de voir si la quantité d'actine recrutée à la membrane est modifiée lorsque le recrutement de ARH change. En effet, si une toute petite et une grande activation entraînent une polymérisation d'actine identique, cela signifie que le système est saturé en RhoA actif.

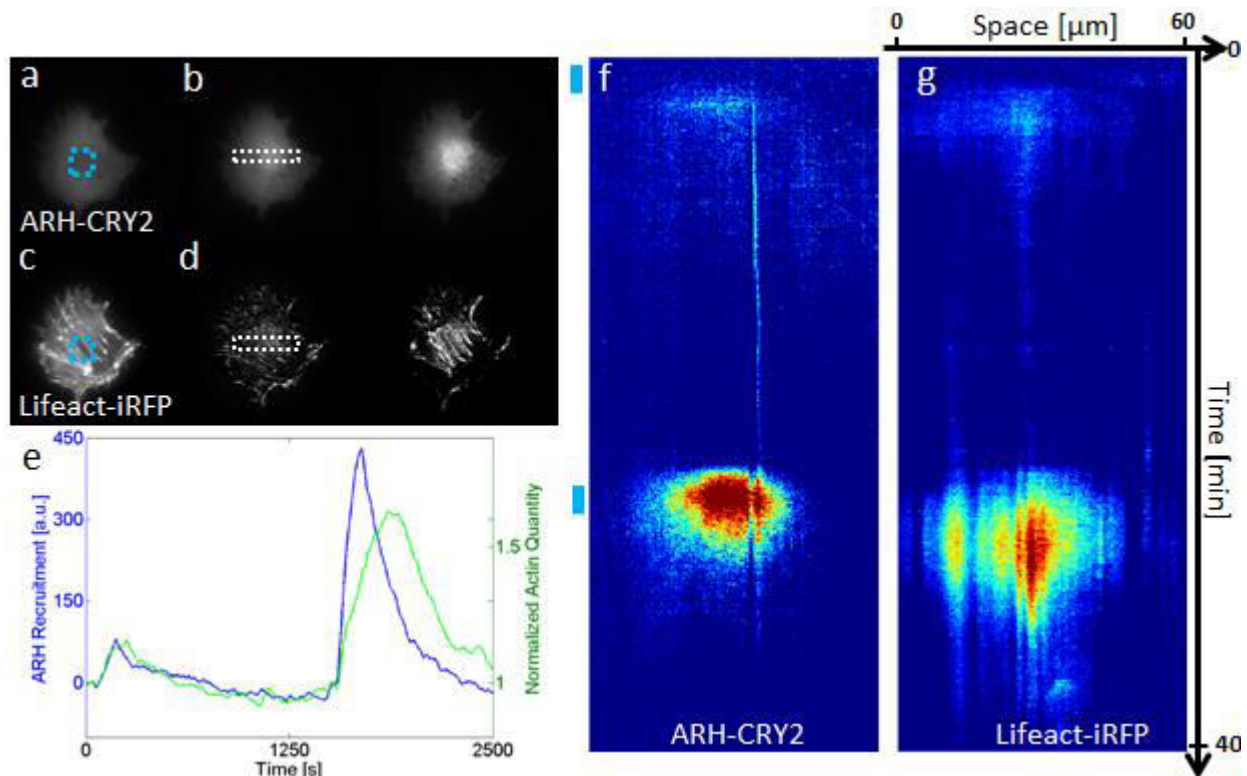


Figure 4-8 : Observation des conditions de non saturation du recrutement d'actine. (a, b) Image TIRF mCherry du recrutement de ARH avant (a) et après (b) les deux types de pulses effectués. Ces recrutements ont été créés à partir de huit pulses ($T=25s$) puis de quarante pulses ($T=5s$). (c) Image TIRF du signal iRFP associé à Lifeact. (d) Image différentielle du signal TIRF iRFP entre avant et après la première, respectivement la seconde activation. (a-d) Hauteur des images : $130\ \mu m$. (e) En bleu, quantification du recrutement de ARH moins sa valeur initiale. En vert, quantification de l'actine normalisée par sa valeur initiale. (f, g) Kymographes des signaux TIRF de ARH et Lifeact le long des rectangles tracés sur les images (b) et (d). Largeur des kymographes : $60\ \mu m$, hauteur : 2500 secondes

Lorsque nous activons une même cellule pendant 3 minutes avec une période soit de 25 secondes soit de 5 secondes, deux niveaux de ARH-CRY2 différents sont créés (Figure 4-8, a-d). Ces deux niveaux entraînent alors deux recrutements d'actine de niveaux différents. Dans ces conditions de recrutement, le système n'est pas saturé en RhoA. Par ailleurs, les kymographes de ces expériences (Figure 4-8, f, g) indiquent deux éléments supplémentaires :

- actine et ARH sont recrutés au même endroit dans la cellule,
- l'actine ne diffuse pas spatialement.

Quand nous quantifions ces recrutements (Figure 4-8, e), il apparaît qu'ils se ressemblent, mais le signal actine ne suit pas exactement celui de ARH-CRY2-mCherry. Pour essayer de mieux comprendre la dynamique de ces phénomènes et analyser nos données, nous avons décidé de créer un modèle d'interaction entre ARH et l'actine.

4.2.3 Modèle d'interaction GEF actine

Nos hypothèses pour ce modèle d'interaction sont les suivantes :

- i) initialement, l'actine est polymérisée avec un taux k_0 ,
- ii) en présence de ARH-CRY2-mCherry (noté ici G^*), elle est polymérisée avec un taux $\alpha(G^*)$ proportionnel à G^* ,
- iii) l'actine disparaît avec un taux k_{off} ,
- iv) la quantité d'actine totale est conservée,
- v) les filaments d'actine créés ne diffusent pas, ni à la membrane, ni dans le cytoplasme.

Les différentes étapes de cette activation sont résumées par un schéma simple présenté sur la Figure 4-9.

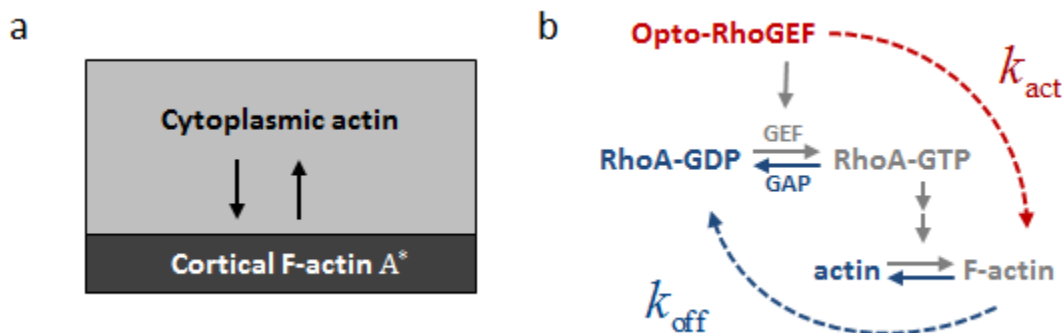


Figure 4-9 : Schéma modèle des interactions théoriques entre ARH et actine. (a) Modèle à deux boîtes où l'actine est, soit dans le cytoplasme, soit à la membrane. (b) Schéma récapitulatif du réseau de signalisation commun à l'activation de RhoA et à la formation d'actine filamenteuse.

En réalité, au moins trois processus successifs sont impliqués derrière la polymérisation d'actine à partir du recrutement de ARH (point ii)) : l'activation locale de RhoA, l'activation de formines, puis la polymérisation d'actine.

De plus, il est important de préciser ici la différence entre dissociation et disparition d'actine. Le phénomène considéré ici est la disparition du signal actine. Le temps impliqué, tenant compte de la dynamique de certaines protéines en amont, sera toujours supérieur ou égal à la valeur du temps caractéristique de dissociation de l'actine.

Soit A la quantité d'actine dans le cytoplasme et A^* à la membrane. Les hypothèses i), ii), et iii) se traduisent par l'équation :

$$\frac{dA^*}{dt} = (k_0 + \alpha(G^*))A - k_{off}A^*,$$

où $\alpha(G^*) = k_{act}G^*$. L'hypothèse iv) se résume par la condition :

$$A + A^* = A_0.$$

L'équation précédente se réécrit alors sous la forme

$$\frac{dA^*}{dt} + fA^* = g, \quad (4.1)$$

avec

$$g = (k_0 + k_{act}G^*)A_0, \quad (4.2)$$

$$f = k_{off} + k_0 + k_{act}G^*. \quad (4.3)$$

Ici, k_{off} et k_0 sont en s^{-1} , tout comme le produit $k_{act}G^*$. G^* étant proportionnel à une unité de fluorescence (uf), alors k_{act} est en $s^{-1}uf^{-1}$. Par simplicité, k_{act} sera désormais noté sans unité. Il est important de préciser ici que, sur un jeu de données, les expériences étant réalisées en parallèle, les paramètres d'imagerie sont identiques et cette unité de fluorescence est considérée identique pour toutes les cellules.

Nous nous sommes alors intéressés à l'évolution de la réponse théorique A^* en fonction des paramètres dynamiques liés au recrutement et à la disparition d'actine : k_{act} et k_{off} . En fixant les valeurs de $\{k_0, k_{act}, k_{off}\}$, et en introduisant un signal de forme connue pour G^* , nous pouvons résoudre numériquement l'équation (4.1) et obtenir le signal théorique d'actine associé (Figure 4-10).

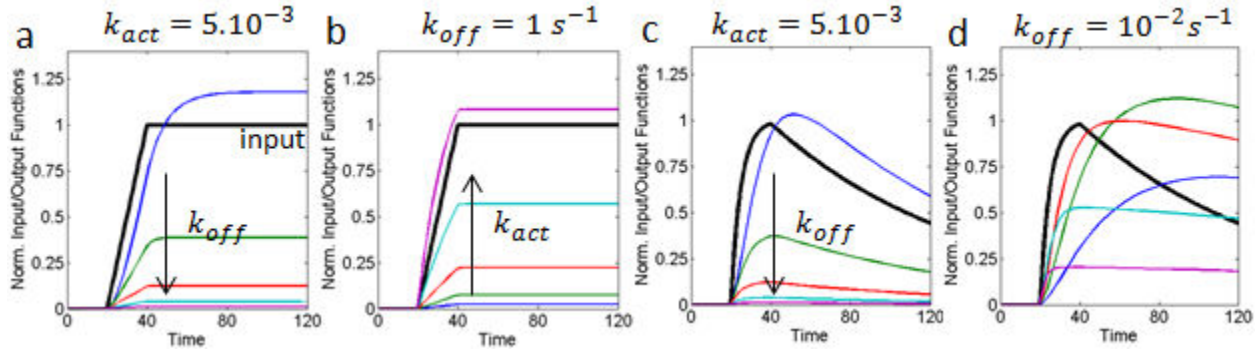


Figure 4-10 : Réponse théorique de l'actine en fonction du profil activateur ainsi que des paramètres k_{act} et k_{off} . (a-d) A partir d'un profil théorique (en noir), différentes courbes de réponse sont obtenues quant au recrutement d'actine en fonction des couples $\{k_{act}, k_{off}\}$. (a, c) Courbes obtenues à k_{act} fixé à 5.10^{-3} pour une variation de k_{off} de 10^{-1} à 10 (du bleu au violet) pour deux profils noirs différents. (b, d) Courbes obtenues à k_{off} fixé à 1 (b) et 10^{-2} (d) pour k_{act} variant de 10^{-2} à 1 (du bleu au violet)

En fixant k_0 à 0 s^{-1} , k_{act} à 5.10^{-3} et en faisant varier k_{off} de 10^{-1} à 10^1 s^{-1} (Figure 4-10, a), les courbes d'actine théorique indiquent que plus k_{off} est grand et plus la hauteur du signal est petite, ce qui est en accord avec le fait que ce paramètre contrôle la disparition d'actine. Par ailleurs, dans le cas d'une activation transitoire (Figure 4-10, c), plus k_{off} est grand et plus la réponse en actine disparaît vite lorsque ARH disparaît.

De la même manière, en fixant k_0 à 10^{-4} s^{-1} et k_{off} à 1 s^{-1} , et en faisant varier k_{act} de 10^{-2} à 1 (Figure 4-10, b), les courbes de réponse montrent que plus k_{act} augmente, plus leur niveau final est haut. La pente à l'origine est, quant à elle, de plus en plus proche de la courbe du signal noir. Cela correspond bien au rôle attendu pour k_{act} : il contrôle la vitesse de polymérisation et la quantité finale d'actine.

Pour dissocier l'effet de ces deux paramètres, nous nous sommes restreints à des cas où il n'y a pas de compétition entre ces paramètres. En effet le terme relatif à la disparition d'actine n'est pas uniquement dû à k_{off} , mais également au produit $k_{act}G^*$, du fait de la conservation de la quantité d'actine, comme l'indique la forme de f (Eq. (4.3)). Nous nous sommes donc toujours placés dans des cas où $k_{off} \gg k_{act}G^*$ de sorte que la disparition soit dominée par k_{off} . Si nous générons des courbes pour lesquelles k_{act} varie de 10^{-2} à 10^1 avec k_{off} égal à 10^{-1} s^{-1} et G^* de l'ordre de 1 , l'évolution de ces courbes, les unes par rapport aux autres, n'est plus aussi simple à apprécier (Figure 4-10, d).

4.2.4 Détermination expérimentale de k_{off}

Polymérisation théorique d'actine

Nous nous sommes alors intéressés aux signaux prédits par l'équation (4.1), en prenant comme signal d'entrée pour G^* les profils expérimentaux de ARH-CRY2-mCherry (Figure 4-11, a). Chaque profil de réponse théorique obtenu pour un couple $\{k_{act}, k_{off}\}$ est, alors, comparé au profil expérimental de l'actine de la même expérience (Figure 4-11, b).

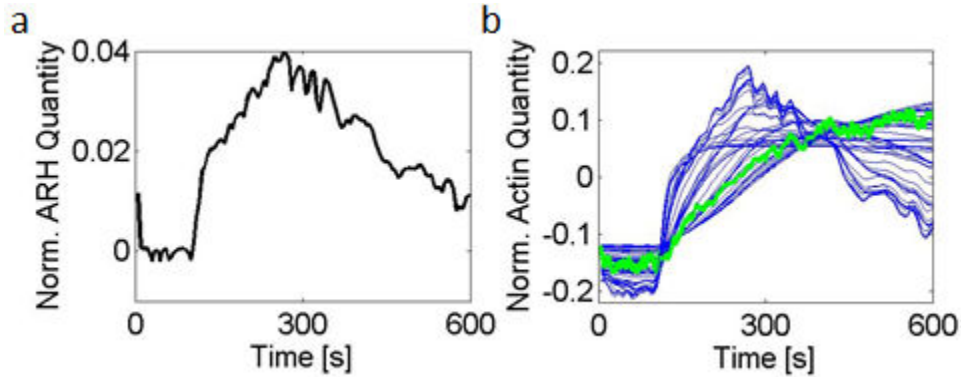


Figure 4-11 : Analyse des relations expérimentales entre ARH et actine. (a) Signal TIRF associé à ARH, moins la moyenne des cinq premières images, normalisé arbitrairement. (b) En vert, signal TIRF iRFP associé à Lifeact. En bleu, courbes d'actine théorique obtenues à partir du signal TIRF de ARH pour des valeurs de k_{act} allant de 2.10^{-3} à 2.10^0 et des valeurs de k_{off} allant de 2.10^{-4} à 2.10^{-1} .

Différentes valeurs de $\{k_0, k_{act}, k_{off}\}$ ont été échantillonnées et nous avons cherché pour quels paramètres la similitude entre les courbes était la plus grande. En pratique, k_0 a toujours été considéré très inférieur à $k_{act}G^*$, k_{act} a été échantillonné sur une échelle logarithmique de 2.10^{-3} à 2.10^0 et k_{off} de 2.10^{-4} à 2.10^{-1} s^{-1} . La Figure 4-11, b, montre qu'à partir d'un signal ARH expérimental en entrée, nous obtenons des courbes d'actine théoriques (en bleu) plus ou moins proches de la courbe expérimentale (en vert).

Quantification de la ressemblance entre deux courbes

Il a été important de définir une méthode pour quantifier le niveau de ressemblance entre courbe théorique et courbe expérimentale. La fonction g (Eq. (4.2)) dépendant d'une constante A_0 inconnue, cela autorise la normalisation de la réponse A^* théorique. En pratique, nous avons fait en sorte que ces courbes ressemblent le plus possible à la réponse expérimentale de l'actine.

La manière la plus commune de faire est de forcer les premiers points de ces courbes à 0 et le niveau final à 1 (exemple Figure 3-2). Cette technique n'est pas optimale car elle donne un poids très fort aux premières et dernières valeurs de ces courbes, alors que l'information peut se trouver ailleurs. De plus, cette technique est très sensible au bruit car elle se base sur peu de

points. Il existe, en revanche, une méthode de minimisation de l'écart quadratique moyen (χ^2) qui cherche les paramètres de translation et d'homothétie générant une normalisation optimale pour faire coïncider deux signaux, ou plus, de même nature (103). Notre mesure de similitude est alors directement reliée au χ^2 : plus sa valeur est petite et plus la similitude est grande.

Pour chacune des expériences, une carte de la valeur de similitude, dont les axes sont les valeurs de k_{off} et k_{act} , est tracée. Il est alors possible d'en extraire le couple de paramètres pour lequel la similitude est la plus grande et représenter la courbe d'actine théorique correspondante sur la courbe expérimentale (Figure 4-12, a). En normalisant ces cartes entre 0 et 1, et en moyennant les expériences effectuées dans des conditions identiques, nous obtenons une carte finale qui représente une carte moyenne de similitude (Figure 4-12, b). Pour un type d'expérience, il est alors possible d'extraire la valeur du couple $\{k_{off}, k_{act}\}$ qui reproduit le mieux les données.

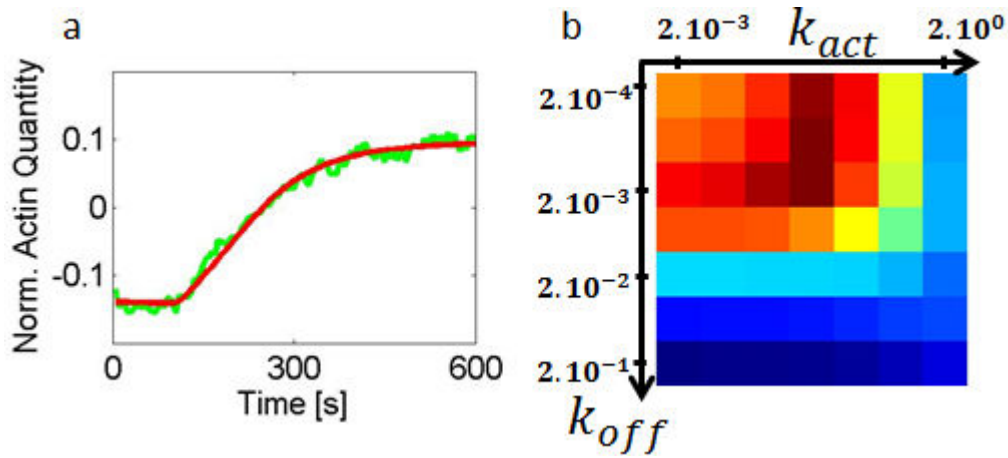


Figure 4-12 : Similitude entre les courbes expérimentales et théoriques de la Figure 4-11. (a) En vert, courbe TIRF de l'actine, en rouge, courbe théorique ressemblant le plus à la courbe expérimentale. (b) Carte moyenne obtenue à partir des cartes de vingt-et-un recrutements d'actine et mesurant la similitude entre courbes expérimentales et courbes théoriques. Du bleu vers le rouge : de plus en plus de similitude.

Ces expériences et analyses déterminent une valeur moyenne pour k_{off} de $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Cette valeur correspond à un temps caractéristique $-1/k_{off}$ - de l'ordre de 8 minutes dont un ordre de grandeur de l'incertitude est donné par l'étendue de la zone de forte similitude, ce qui correspond à des bornes de l'ordre de 4 et 16 minutes pour la valeur du temps caractéristique de disparition de l'actine.

Signification biophysique de k_{off}

Pour mieux appréhender la nature de k_{off} , et de la valeur de 8 minutes mesurée, j'ai réalisé quelques expériences combinant un recrutement court de ARH et une routine de FRAP. Sur ces expériences, il était important d'observer l'évolution temporelle des filaments d'actine, ce qui m'a poussé à utiliser un plasmide codant la β actine, un des constituant principaux des filaments d'actine au lieu de Lifeact.

A partir du moment où l'activation est arrêtée, le niveau d'actine commence à diminuer (courbe bleue ciel, Figure 4-13, c) et nous effectuons alors une routine de FRAP sur une région incluse dans la région de polymérisation d'actine. Elle est donc soumise à la disparition du signal à cause du FRAP ainsi qu'à cause de la disparition du signal ARH-CRY2. Si le phénomène de disparition d'actine est lié uniquement à la dissociation d'actine, au moment où le retour de fluorescence est complet dans la zone de FRAP, le niveau d'actine global doit être redescendu au niveau basal, ce qui n'est pas le cas. Cette expérience met donc en avant expérimentalement que disparition et dissociation d'actine sont deux processus distincts.

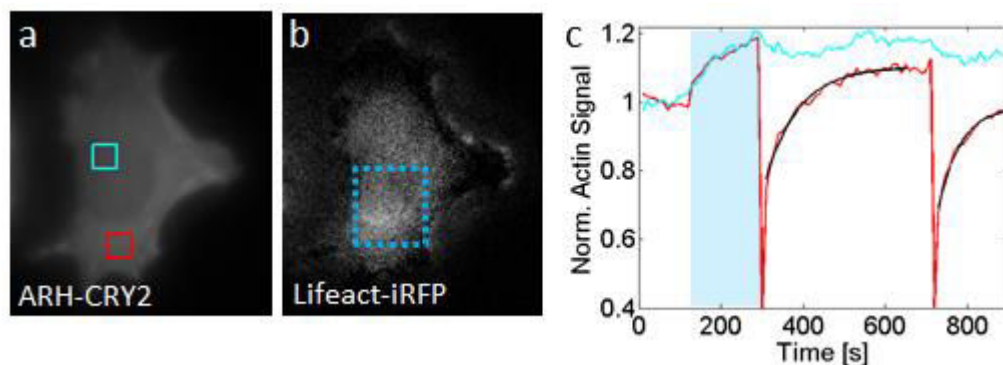


Figure 4-13 : Comparaison des temps caractéristiques de dissociation et disparition de l'actine. (a) Signal TIRF de ARH avant activation. La zone rouge est la zone de FRAP. (b) Signal TIRF iRFP après 2 minutes d'activation dans la région rectangle en pointillés bleus. (a, b) Hauteur des images 75 μ m. (c) Quantification de l'actine dans le carré cyan et dans le carré rouge de (a) au cours du temps. Zone bleue, période d'activation. Lignes noires, ajustements exponentiels du retour de fluorescence.

Il a été reporté lors d'expérience de FRAP et de photoactivation sur l'actine des temps caractéristiques de retour de fluorescence liés à son renouvellement – *turnover* - de l'ordre de 30 secondes (101). Cela concorde avec les mesures effectuées au laboratoire où des temps caractéristiques de retour de fluorescence de l'ordre de 60 secondes ont été déterminés. Le temps caractéristique de la disparition d'actine ne correspond donc pas simplement au temps nécessaire pour que l'actine soit renouvelée mais tient compte des interactions complexes à l'intérieur du réseau de signalisation suggérées par les deux flèches successives au milieu du schéma de la Figure 4-10.

Variabilité de k_{off}

Pour observer la variabilité de la mesure du paramètre k_{off} en fonction du type d'expérience effectuée, nous avons fait varier la taille de la région d'illumination. Trois activations distinctes ont été réalisées sur chacune des cellules testées : une activation locale, une activation totale et une activation sur la moitié des cellules (Figure 4-14, a).

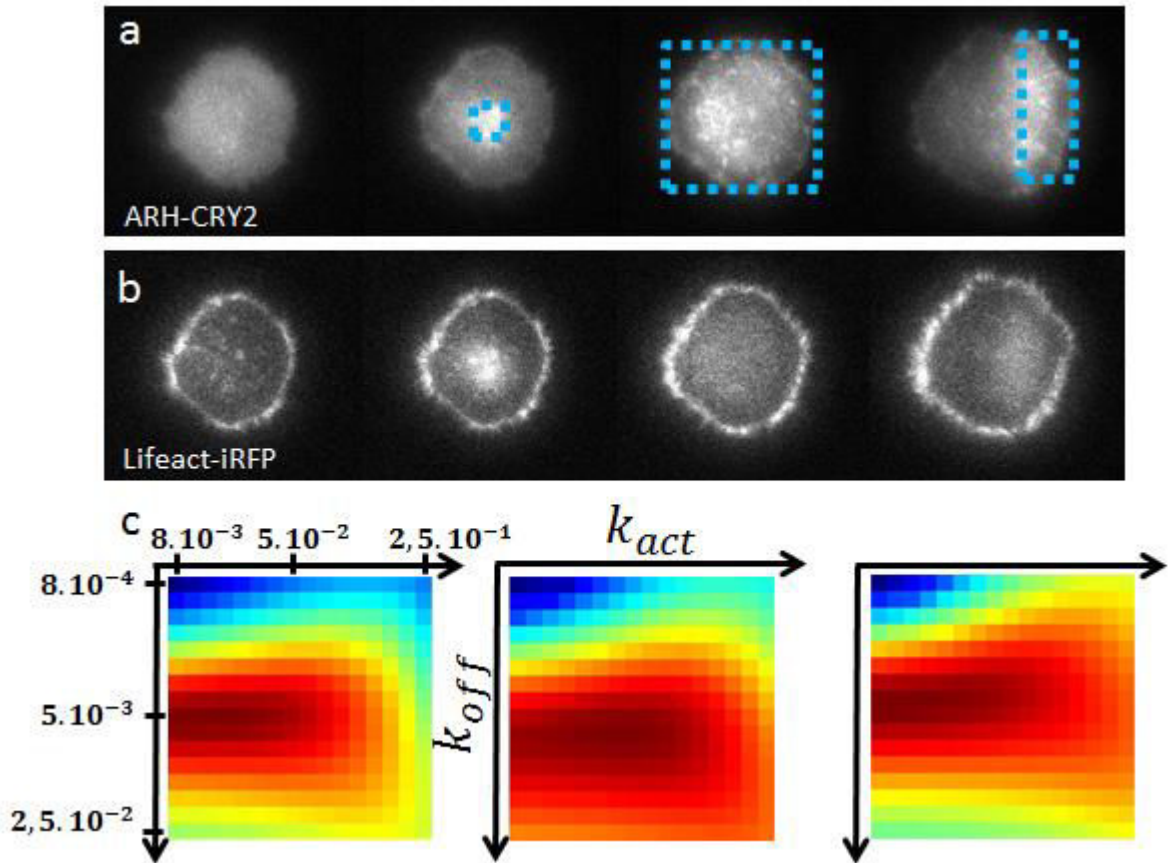


Figure 4-14 : Obtention des caractéristiques de disparition de l'actine en fonction du type d'activation. (a) Images TIRF de ARH avant, ainsi que après les recrutements de ARH. Sont représentés en rectangle pointillés bleus les zones d'activations. (b) Signal TIRF de Lifeact avant, ainsi que après les différents recrutements de ARH. (c) Carte des paramètres $\{k_{off}, k_{act}\}$, moyennée sur douze cellules.

Les écarts entre les bornes respectives de k_{off} et k_{act} ont été diminués pour augmenter la précision de ces expériences. Dans le même but, l'échantillonnage entre ces bornes a été augmenté pour atteindre le test de seize fois seize valeurs de couple $\{k_{off}, k_{act}\}$ distribuées logarithmiquement entre $8 \cdot 10^{-4}$ et $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pour k_{off} et entre $8 \cdot 10^{-3}$ et $2,5 \cdot 10^{-1}$ pour k_{act} . L'analyse des niveaux de recrutement d'actine et la comparaison aux niveaux théoriques, effectués sur douze cellules différentes, permet, à partir des cartes moyennes de similitude,

d'obtenir les valeurs de k_{off} pour l'activation locale, totale et la moitié de la cellule. Les valeurs obtenues sont respectivement de $5,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $4,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Figure 4-14, c).

Deux points peuvent être soulignés sur la reproductibilité de ces expériences. Le premier est que, à région d'activation fixée, les cartes moyennes sont très représentatives des cartes de chaque cellule (Figure 4-15).

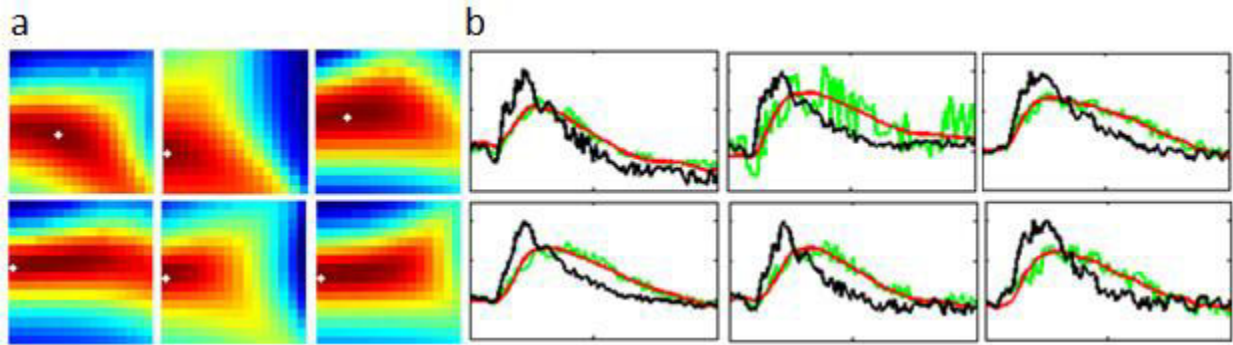


Figure 4-15 : Reproductibilité des cartes de similitudes en fonction des paramètres des paramètres $\{k_{off}, k_{act}\}$. (a) Exemples de carte à partir desquelles a été créé la carte moyenne de la (Figure 4-14, c, gauche). (b) Courbes associées à ces six cartes. En noir, signal expérimental de ARH. En vert, signal expérimental de Lifeact. En rouge signal théorique obtenu pour les valeurs de k_{off} et k_{act} maximisant la similitude – point blanc sur les cartes de (a).

Le deuxième point est que, d'une forme d'activation à une autre, les temps caractéristiques ne varient pas de plus de 25%. Par ailleurs, nous notons que toutes les activations ne contraignent pas de la même manière les valeurs du couple $\{k_{off}, k_{act}\}$, il semble, en effet, que l'incertitude sur la détermination de k_{off} est réduite en diminuant la taille de la région.

Nous avons obtenu de ces expériences un temps caractéristique de disparition de l'ordre de 3 minutes et 30 secondes, ce qui est en accord avec les valeurs trouvées précédemment et à nouveau supérieur au seul temps de dissociation de l'actine.

Test du modèle

Pour tester davantage ce modèle, nous avons répété ces analyses en tenant compte du fait que le niveau final de ARH est contrôlable expérimentalement et ainsi avons créé successivement deux recrutements d'actine de niveaux différents (Figure 4-16, b). Il est alors apparu que, sans modifier notre manière d'analyser les courbes, nous obtenons des valeurs de paramètres qui, à partir des profils de ARH, génèrent des courbes d'actine théoriques proches des courbes expérimentales (Figure 4-16, c).

Nous observons de plus sur les cartes représentant la similitude entre les courbes en fonction des couples $\{k_{off}, k_{act}\}$ que l'incertitude sur ces valeurs est répartie différemment ce qui s'explique par le fait que les contraintes à respecter pour ressembler au signal expérimental

sont différentes. Le coefficient k_{off} ainsi obtenu est de l'ordre 4.10^{-3} s^{-1} ce qui correspond à un temps caractéristique de 2 minutes, en accord avec ceux déterminés précédemment.

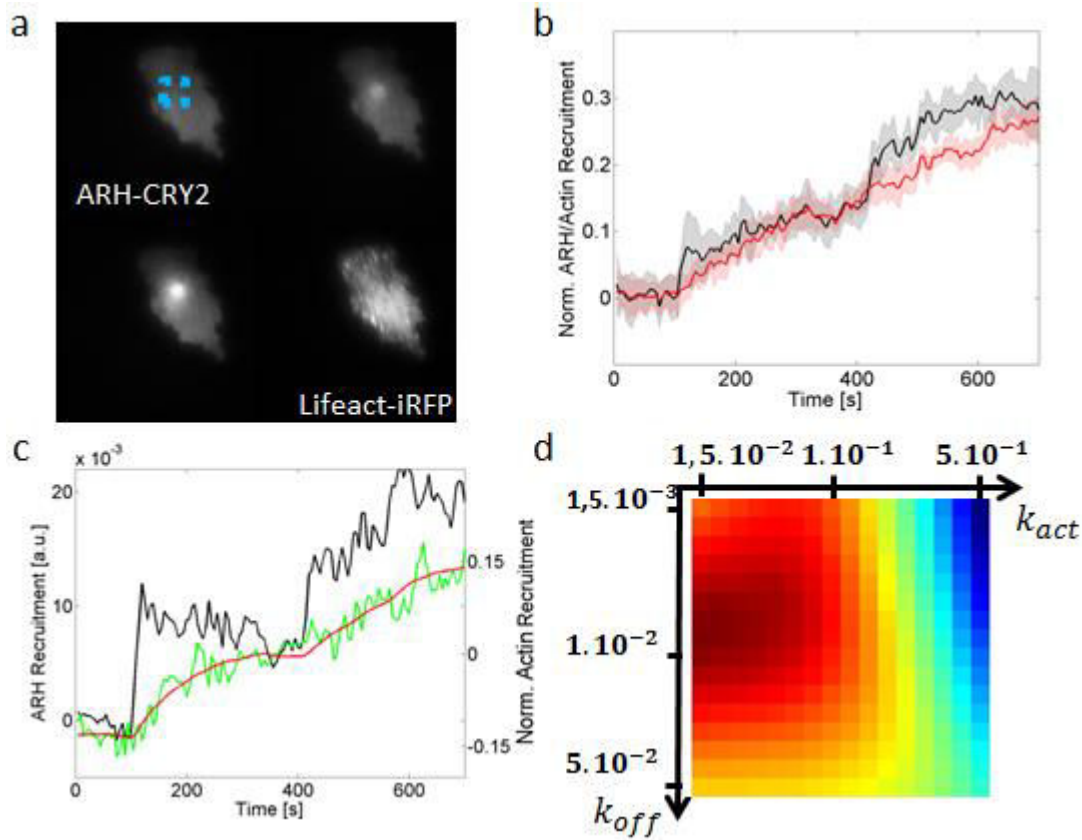


Figure 4-16 : Recrutement à deux étages de ARH et d'actine. (a) Images TIRF de ARH avant activation (haut gauche), après la première routine d'activation (haut droite) et après la seconde routine d'activation (bas gauche). (bas droite) Image TIRF de Lifeact-iRFP avant activation. Hauteur des images : 130 μm . (b) Signaux de ARH (noir) et de l'actine (rouge) moyennés sur la zone d'activation et sur onze cellules différentes. Zones transparentes : variations pour les onze cellules (écart type). (c) Exemple sur une cellule du résultat donné par la routine pour obtenir les valeurs de k_{off} et k_{act} . En noir, signal expérimental de ARH. En vert, signal expérimental de Lifeact et en rouge signal théorique obtenu pour les valeurs de k_{off} et k_{act} maximisant la similitude. (d) Carte des paramètres $\{k_{off}, k_{act}\}$ moyennée sur onze cellules.

4.2.5 Interactions ArhGEF11/RBD

Les expériences de polymérisation d'actine à partir d'un recrutement de ARH indiquent qu'il y a un temps caractéristique interne au processus de disparition d'actine - de l'ordre de 2 à 4 minutes. Ce temps caractéristique peut avoir pour origine n'importe quel acteur moléculaire au sein de ce réseau de signalisation, comme le temps mis par RhoA pour retourner dans son état inactif après une activation, par exemple.

Pour aborder ce problème, j'ai réutilisé certaines des expériences présentées dans le Chapitre précédant où je recrute ARH et regarde l'activation de RhoA à travers le recrutement

local de RBD-iRFP. Les corrélations entre la perturbation ARH et le recrutement de RBD-iRFP sont analysées en utilisant le même modèle que celui utilisé pour l'actine, ce qui détermine des paramètres $\{k_{off,RBD}, k_{act,RBD}\}$ pour lesquels il existe une grande similitude entre courbes expérimentales et courbes théoriques. A la différence des analyses réalisées précédemment, les valeurs de $k_{off,RBD}$ obtenues sont de l'ordre de $3.10^{-1,4}$ à $1.10^{-1,2} \text{ s}^{-1}$, ce qui correspond à des valeurs de temps caractéristiques de l'ordre de 15 à 25 secondes.

Ce temps de réponse n'est pas le paramètre limitant expliquant le délai lié à la disparition d'actine. Il montre cependant le caractère dynamique de la désactivation des RhoGTPases.

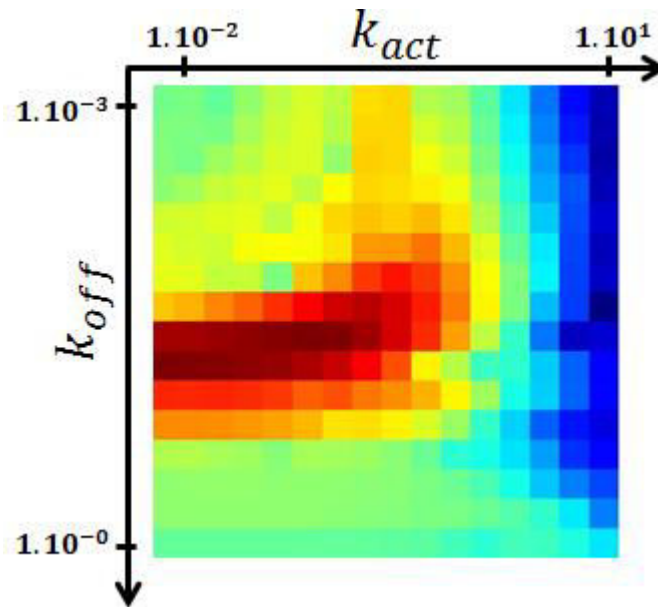


Figure 4-17 : Dynamique de recrutement et de disparition de RBD-iRFP. Carte des paramètres obtenus dans le cas d'un recrutement ARH lorsque nous quantifions, en parallèle, le recrutement de RBD moyenné sur les 30 activations analysées. Le coefficient k_{off} obtenu est de l'ordre de $10^{-1,3} \text{ s}^{-1}$.

4.2.6 Modèle spatial

Nous venons de présenter un modèle qui ne considère que deux compartiments possibles pour l'actine : de l'actine cytoplasmique et de l'actine filamenteuse à la membrane - là où ARH est activée. Dans le cas d'activations subcellulaires, il est évident que de l'actine se trouve dans un troisième compartiment : sous forme filamenteuse, mais dans une région où aucun recrutement n'est effectué (Figure 4-18, b).

Le modèle à deux compartiments reproduit correctement les résultats d'activation aux temps courts. Cependant, il risque de fonctionner moins bien aux temps longs, parce que nous n'avons pas tenu compte du troisième compartiment. Le phénomène mis de côté dans ce

modèle est que, dans le cytoplasme, la déplétion en actine monomérique se rééquilibre avec l'actine présente dans la région non activée.

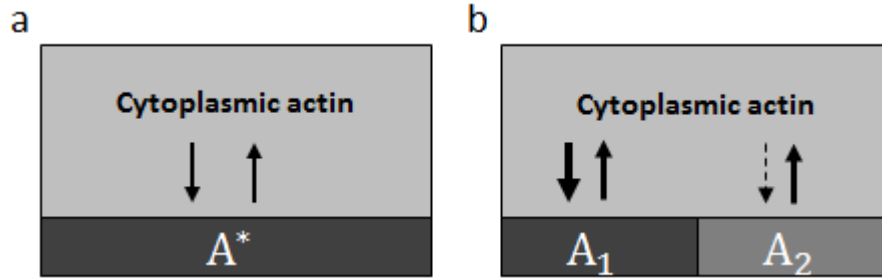


Figure 4-18 : Schéma résumé des modèles à deux (a) et trois (b) compartiments. Dans ce second modèle, l'actine est considérée soit cytoplasmique (gris clair), soit sous forme de filaments à la membrane dans une région neutre (A_2) et dans une région de recrutement de ARH (A_1). Les flèches résument l'équilibre en actine entre les différents compartiments lors d'un recrutement de ARH.

Nous allons regarder théoriquement l'effet de l'ajout d'un troisième compartiment au système et comparer les prédictions de ce modèle aux résultats expérimentaux. Soit A_1, A_2 et A_c les concentrations d'actine filamenteuse à la membrane, respectivement dans la région activée (1) et la région non illuminée (2), et dans le cytoplasme (C) sous forme de monomères. Nous considérerons à nouveau les hypothèses évoquées précédemment concernant les taux de production et de disparition de l'actine. De plus, nous supposerons toujours qu'il n'y a pas de diffusion à deux dimensions d'actine filamenteuse. Les équations d'évolution de la quantité d'actine dans chacune des régions s'écrivent alors :

$$\frac{dA_2}{dt} = k_0 A_c - k_{off} A_2, \quad (4.4)$$

$$\frac{dA_1}{dt} = (k_0 + k_{act} G^*) A_c - k_{off} A_1, \quad (4.5)$$

$$\frac{dA_c}{dt} = -(2k_0 + k_{act} G^*) A_c + k_{off} (A_1 + A_2).$$

En tenant compte de la conservation de la quantité totale d'actine A_T ,

$$A_1 + A_2 + A_c = A_T,$$

et en sommant les équations (4.4) et (4.5), nous obtenons (en posant $A_s = A_1 + A_2$):

$$\frac{dA_s}{dt} = (2k_0 + k_{act}G^*)A_T - (k_{off} + 2k_0 + k_{act}G^*)A_s, \quad (4.6)$$

$$\frac{dA_1}{dt} = (k_0 + k_{act}G^*)(A_T - A_s(t)) - k_{off}A_1. \quad (4.7)$$

Nous vérifions, avant tout, la cohérence de ces équations en s'intéressant à leur état stationnaire. L'équation (4.6) donne alors :

$$A_s = \frac{1}{1 + \frac{k_{off}}{2k_0 + k_{act}G^*}} A_T. \quad (4.8)$$

Cette équation (4.8) indique que plus ARH est recruté - plus G^* est élevé - et plus la quantité totale d'actine à la membrane est importante, ce qui est cohérent. Par ailleurs, si le taux de disparition d'actine k_{off} augmente, nous obtenons effectivement que A_s diminue. En considérant le régime permanent de l'équation (4.7) et en remplaçant A_s par sa valeur stationnaire, nous déterminons la valeur des concentrations A_1 et A_2 :

$$A_1 = \frac{1}{1 + \frac{k_0 + k_{off}}{k_0 + k_{act}G^*}} A_T \quad (4.9)$$

$$A_2 = \frac{1}{1 + \frac{k_{off} + k_0 + k_g G^*}{k_0}} A_T \quad (4.10)$$

Ces équations (4.9) et (4.10) indiquent que A_1 augmente et que A_2 diminue lorsque ARH augmente, ce qui est cohérent avec l'idée d'un réajustement global des équilibres dynamiques entre les différents compartiments quand la région (1) est activée.

Pour un profil de G^* et des paramètres $\{k_0, k_{act}, k_{off}\}$ donnés, il est possible de résoudre numériquement l'équation (4.6), obtenir ainsi le profil temporel théorique de A_s , insérer ce profil dans l'équation (4.7) et la résoudre numériquement. En utilisant des valeurs de paramètres en accord avec ceux déterminés précédemment ($k_{off}=2.10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{act}=10^{-1}$) et en prenant $A_T=1$, $k_0=10^{-2} \text{ s}^{-1}$, nous obtenons des courbes présentant l'évolution de l'actine dans les deux régions membranaires (Figure 4-19, a).

Les courbes théoriques obtenues montrent qu'un recrutement de ARH dans la région (1) crée une première augmentation rapide du niveau d'actine alors que le niveau dans la région (2) ne change pas. Ensuite, le niveau d'actine dans cette deuxième région commence à diminuer ce qui rend possible la polymérisation ultérieure de filaments d'actine dans la région (1), ce qui n'est pas possible avec le modèle à deux compartiments.

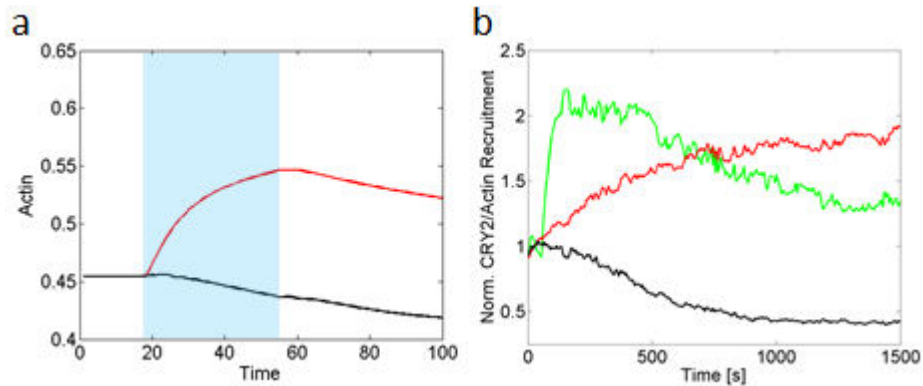


Figure 4-19 : Importance du modèle à trois compartiments. (a) Réponse théorique des niveaux d'actine dans la région d'activation (en rouge) et dans la deuxième région à la membrane (en noire). En bleu est représentée la période d'activation. (b) Signaux expérimentaux du recrutement de ARH (en vert), du recrutement de Lifeact dans la région d'activation (en rouge) et dans une région éloignée (en noir).

Expérimentalement, lors du recrutement de ARH et de l'observation de l'actine au cours du temps, le même type de comportement a été constaté (Figure 4-19, b) : une augmentation rapide d'actine dans la région d'activation et une diminution du signal, après un délai de 1 à 2 minutes, dans une région éloignée.

Comme nous l'avons vu pour les activations de RhoA, le phénotype de changement de polarité apparaît pour des temps supérieurs à la dizaine de minute. Cela pourrait s'expliquer par l'importance de fournir localement une grande quantité d'actine pour générer suffisamment de contraction dans la zone d'activation. Cela pourrait, de plus, être nécessaire pour affaiblir la structure de la cellule à longue distance et créer la protrusion.

4.3 Interactions acto-myosines

Nous venons de voir que la quantité de ARH-CRY2 à la membrane contrôle la quantité d'actine filamenteuse dans cette région. Cependant la rétraction de la cellule s'explique difficilement par l'augmentation de la quantité d'actine seule. Par ailleurs nous avons vu que les points focaux subissent des contraintes locales importantes lors d'une activation locale de RhoA, ce qui met en avant la possible implication de moteurs moléculaires.

Ces observations sont en accord avec le schéma présenté en introduction (Figure 1-17) qui indique que l'activation asymétrique de RhoA favorise la phosphorylation des myosines II par l'activation de la kinase ROCK, ce qui augmente l'activité contractile des cellules, en parallèle à de la polymérisation d'actine (104) (105).

Pour comprendre cette rétraction, il faut envisager une augmentation soit du nombre, soit de la densité, soit de l'activité, des myosines II. Nous avons donc décidé d'observer le rôle de ces myosines et de leurs interactions avec l'actine au cours de recrutement de ARH, pour comprendre la manière dont la cellule se rétracte.

4.3.1 Observations

Pour observer la localisation des myosines, nous avons réalisé un plasmide codant une fusion entre iRFP et la protéine MRLC1 (*Myosin Regulatory Light Chain*), une des protéines constituant les myosines. En comparant la localisation cellulaire de ces protéines à ce que nous connaissons de la localisation de l'actine, nous notons que ces structures sont principalement des fibres de stress, soit aux bords des cellules, soit à proximité de la membrane basale.

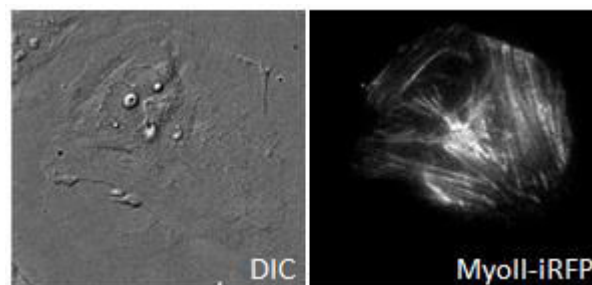


Figure 4-20 : Organisation cellulaire des myosines. Images DIC et TIRF associées à la protéine MRLC1-iRFP d'une cellule étalée sur lamelle. Hauteur des images : 90 μm .

Les observations que je présente ici, basées sur deux expériences particulières, sont communes à la majorité des expériences réalisées. A nouveau, dans ces expériences, le recrutement local de ARH entraîne une rétraction locale de la cellule (Figure 4-21).

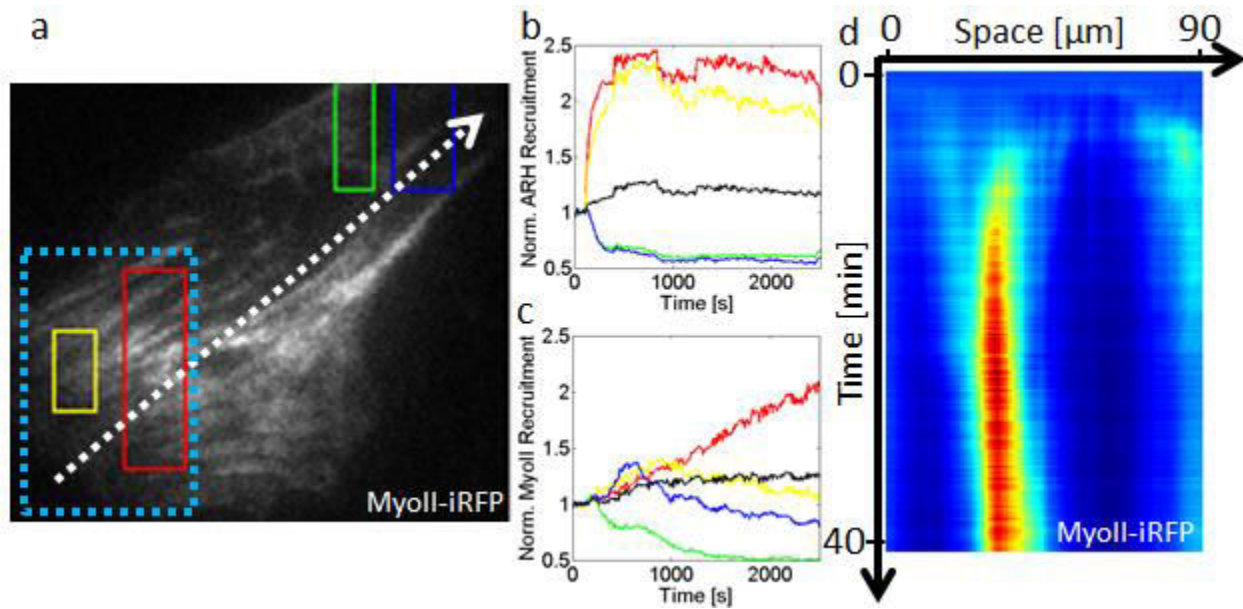


Figure 4-21 : Localisation des myosines lors d'un recrutement local de ARH. (a) Image TIRF du signal MRLC1-iRFP. Hauteur de l'image : 65 μm . (b, c) Quantification de la fluorescence des signaux TIRF ARH (b) et TIRF MRLC1-iRFP (c) moyenné dans les régions de (a). La courbe noire est relative à une région constituée de toute la cellule. (d) Kymographe de la distribution des myosines la long de la flèche blanche représentée sur (a).

Lors du recrutement de ARH, la fluorescence associée au signal MRLC1 augmente et ce même dans des régions loin de la zone d'activation (Figure 4-21, b, c). Cependant, moins de 2 minutes après le début de ces activations, le signal des myosines commence à être réorganisé spatialement. Il continue de s'enrichir là où est localisé ARH mais diminue partout ailleurs dans la cellule - sauf à l'extrémité opposée de celle-ci où il faudra environ 8 à 10 minutes pour que le signal commence à diminuer (région bleue, Figure 4-21, c). Les kymographes de cette figure indiquent que l'augmentation de la concentration de ces protéines dans la zone de recrutement est progressive et s'établit sur une durée de l'ordre de 30 minutes, la rétraction et la protrusion ayant lieu quant à elles à partir d'une quinzaine de minute.

Nous sommes en présence d'un problème où il est difficile de décorréler trois effets :

- le mouvement de la membrane,
- l'augmentation de la quantité de myosines,
- l'enrichissement d'actine – non observable sur ces expériences mais support à l'activité des myosines.

D'après les temps caractéristiques observés précédemment, il semble que l'actine soit recrutée avant le mouvement de membrane. Mais comment comprendre le recrutement à court terme des myosines ? Est-il associé au recrutement d'actine ou bien est-il uniquement à relier à l'activité de ROCK dans la cellule ? L'enrichissement à long terme est également compliqué à comprendre. Est-il dû à l'action de ROCK ou bien à la rétraction de la membrane qui entraîne une augmentation locale de la densité de myosines ? Pour essayer de répondre à

ces questions il est apparu nécessaire de trouver un moyen d'observer les signaux actine et myosine en parallèle.

4.3.2 ArhGEF11-CRY2- Δ (mCherry)

Nous avons vu précédemment qu'il est impossible d'observer la fluorescence de signaux dont la longueur d'onde d'excitation se situe en dessous de 530 nm sans activer CRY2. Pour observer en parallèle les signaux actine et myosine en parallèle, il faut utiliser les fluorophores mCherry et iRFP. La stratégie que j'ai développée consiste à retirer mCherry du plasmide codant la protéine ARH-CRY2-mCherry. En effectuant alors une quadruple transfection avec CIBN-GFP, ARH-CRY2- Δ (mCherry), Lifeact-mCherry et MRLC-iRFP, nous espérons avoir accès à une partie des réponses à nos questions. Par ailleurs, nous validons *a posteriori* que les cellules observées sont bien transfectées par le plasmide ARH-CRY2- Δ (mCherry) par l'observation d'une rétraction locale (Figure 4-22).

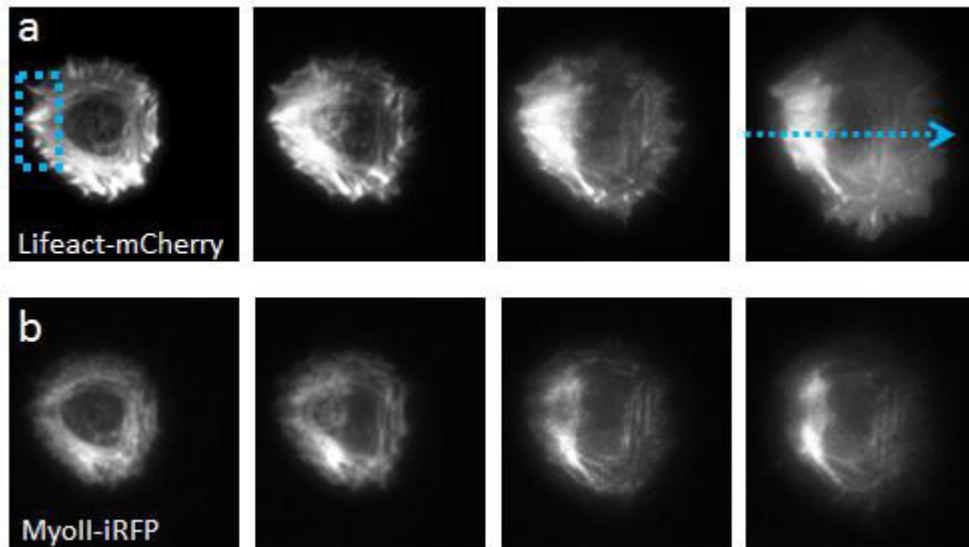


Figure 4-22 : Observation en parallèle de l'actine et des myosines pendant un recrutement local de ARH. (a, b) Signal TIRF de l'actine (a) et des myosines (b) 1, 20, 40 et 60 minutes après le début de l'expérience. La zone d'activation est représentée par le carré en pointillés bleus. L'axe de quantification des kymographes de la Figure 4-23 et de la Figure 4-24 est représenté par la flèche. Hauteurs des images : 80 μ m.

Ce film présente l'augmentation locale de la quantité d'actine et de myosine au cours du temps ainsi que le mouvement global de la cellule lié au recrutement de ARH. Nous avons tracé des kymographes dont l'axe passe par la perturbation et le point le plus éloigné de la cellule pour visualiser le plus précisément possible l'évolution spatiotemporelle de ces quantités, en tenant compte de la création d'une polarité avant/arrière. Nous notons, en particulier, que le kymographe obtenu à partir du signal MRLC1 du film de la Figure 4-22 présente un profil (Figure 4-23, c) semblable à celui obtenu dans le cas de la Figure 4-21.

Pour comprendre leur rôle dans la création de la polarité avant/arrière des cellules. Nous allons donc chercher dans ces films les différences et les ressemblances entre les images de l'actine et celles de la myosine.

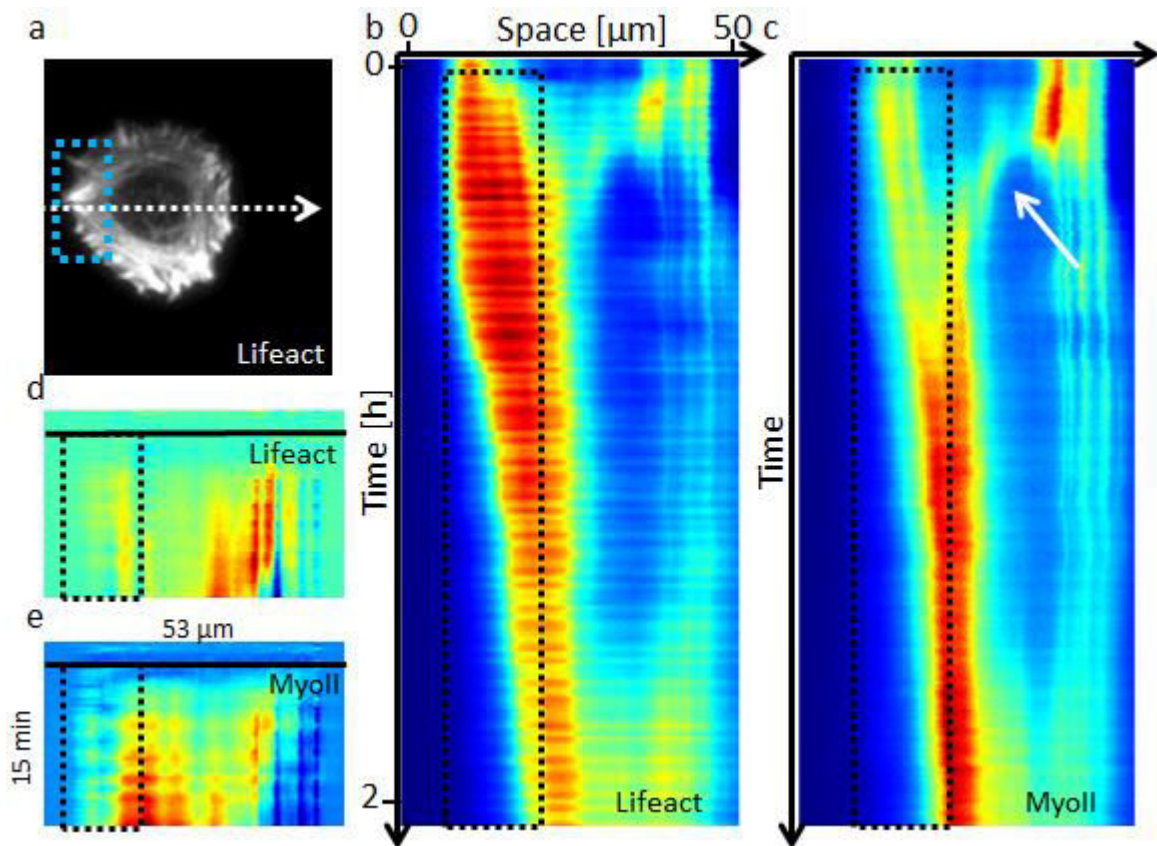


Figure 4-23 : Représentation de la localisation de l'actine et des myosines lors d'un recrutement de ARH local. (a) Signal TIRF de Lifeact-iRFP. Hauteur de l'image : 80 µm. La flèche représente l'axe selon lequel sont représentés les kymographes (b-e). (b-e) Kymographes de largeur 53 µm associées aux signaux TIRF des myosines (c, e) et de l'actine (b, d) aux temps courts, de 0 à 15 minutes (d, e) et aux temps longs, de 0 à environ 2 heures (b, c). Sur (d) et (e) le signal représenté est le signal brut auquel est soustrait la valeur de la première image.

Entre 2 et 5 minutes après le début des activations, actine et myosines sont recrutées partout dans la cellule (Figure 4-23, d, e). Une explication probable de ce phénomène est que ARH est recruté un partout dans la cellule lors des premières activations. Cela explique l'augmentation quasi instantanée de la quantité d'actine mais pas l'augmentation du signal myosine. Le seul processus en accord avec ce qui suit est qu'avant l'activation, il existe une réserve d'actine et de myosine dans le cytoplasme. L'actine filamentueuse, quant à elle, serait initialement saturée en moteurs moléculaires. Lorsque ARH est recrutée, cela entraîne la formation de filaments d'actine « nus », accessibles aux myosines cytoplasmiques qui s'y fixent.

Après cette période initiale, le signal relatif à l'actine dans la zone d'activation continue à augmenter au cours du temps, alors que le signal lié aux myosines ne progresse plus. Nous observons ici la première différence entre les deux signaux : la localisation beaucoup plus rapide

(en 10 minutes) d'une réserve d'actine locale très importante qui est ensuite suivie par une augmentation de MRLC1-iRFP (en 25 minutes). Concomitamment à cette augmentation, la membrane de la cellule commence à se rétracter. Dès lors, il est difficile de savoir si cette augmentation est due à la rétraction de la membrane ou bien si elle a entraîné cette rétraction.

De plus, nous observons sur la Figure 4-23, c, plusieurs signaux MRLC1 qui collapser. L'un vient du bord extérieur de la cellule et l'autre vient de l'intérieur de la cellule (flèche blanche). Il est possible que ce mouvement, au cours duquel la quantité d'actine reste constante, soit dû à l'activité des myosines seules, leur enrichissement ayant pour origine un collapse des zones riches en acto-myosine plutôt qu'une relocalisation par diffusion dans le cytoplasme.

Sur ces expériences, j'ai réalisé deux autres types d'analyse. J'ai tracé le produit point par point du kymographe de l'actine avec celui de la myosine, qui peut être interprété comme une mesure potentielle de la capacité à se contracter d'une cellule (Figure 4-24, a). Ce kymographe indique que le produit actine fois myosine atteint des niveaux supérieurs aux niveaux initiaux au cours de l'activation de RhoA.

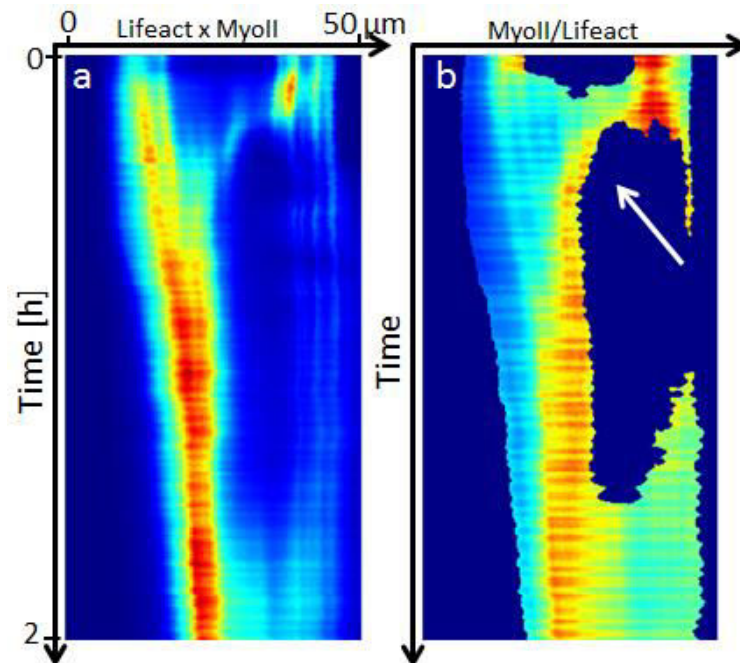


Figure 4-24 : Représentation de deux caractéristiques du réseau d'acto-myosine pour un recrutement local de ARH. (a, b) Kymographe de la même expérience que celle présentée sur la Figure 4-23. (a) Représentation du produit du signal d'actine par le signal myosine. (b) Représentation du quotient du signal myosine par le signal actine. Les pixels pour lesquels l'actine était en dessous du bruit ont été mis à 0. Largeur des kymographes : 53 μm . Longueur : environ 2 heures.

Sur le deuxième kymographe de cette figure (Figure 4-24, b), j'ai représenté un équivalent de la densité de myosines par unité d'actine, en calculant pour chaque pixel le rapport de la quantité de MRLC1 sur le signal actine. Nous notons ainsi que, lors du recrutement d'ARH, il est

impossible d'obtenir des densités supérieures à celles initialement présentes dans les cellules, ce qui conforte l'idée qu'initialement, les filaments d'actine sont saturés en myosines.

Nous notons également sur ces kymographes le décalage temporel entre recrutement d'actine et de myosine, ainsi que le collapse de la zone de haute densité vers la zone d'activation (flèche blanche).

4.3.3 Dynamique des myosines

Nous pouvons également regarder la dynamique des myosines dans les cellules pour comprendre les phénomènes impliquant le réseau d'acto-myosine. En réalisant des expériences de FRAP sur des cellules exprimant MRLC1-iRFP, nous avons accès au temps caractéristique de retour de fluorescence associé au phénomène de dissociation/association des myosines.

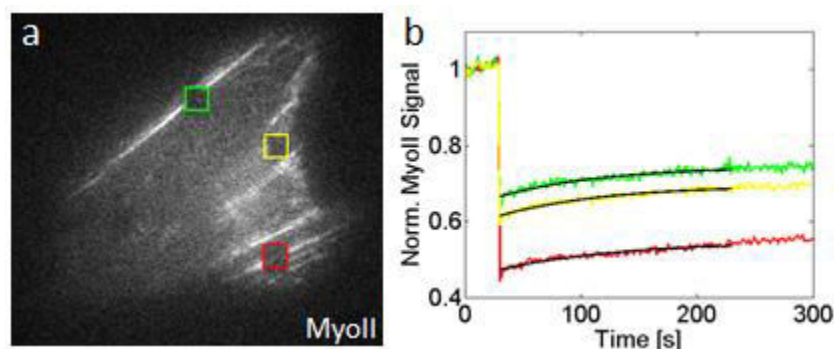


Figure 4-25 Quantification de la dynamique de MRLC1. (a) Image TIRF iRFP d'une cellule transfectée avec MRLC2-iRFP juste après une routine de FRAP sur les trois régions carrées représentées en vert, jaune et rouge. Hauteur de l'image : 85 μm . (b) Quantification de la fluorescence au cours du temps dans les trois régions de FRAP. Les valeurs obtenues concernant les temps caractéristiques sont de 107s, 92s et 93s pour les régions respectivement rouge, verte et jaune. En noir est représenté le résultat des ajustements exponentiels.

Sur ces expériences, nous avons mesuré des temps caractéristiques de retour de fluorescence de l'ordre de 90 secondes $\pm$ 20 secondes sans observer de différence particulière entre la dynamique sur des fibres de stress et sur des zones plus dispersées en actine. Ces résultats sont en contradiction avec des expériences similaires, effectuées sur des cellules M2, où il a été déterminé des temps caractéristiques de retour de fluorescence de l'ordre de 5 secondes (101).

Un point important à noter sur ces expériences est la présence, à cette échelle temporelle, d'une grande fraction immobile. En effet, le niveau de fluorescence ne remonte pas à plus de 40 pourcent de son niveau le plus bas. Cela signifie que 60 à 80 pourcent des protéines qui sont photoblanchies, sont impliquées dans une dynamique d'attachement/dissociation à l'actine, dont le temps caractéristique est d'au moins un ordre de grandeur supérieur, soit une dizaine de minutes. D'autres expériences de FRAP, avec un intervalle de temps plus grand, permettraient d'en obtenir une valeur plus précise.

Si ces valeurs de temps de retour de fluorescence des myosines sont effectivement de l'ordre de la dizaine de minutes, cela soulignerait alors l'importance de la polymérisation/disparition d'actine pour les localiser spécifiquement - le signal ROCK étant lui simplement responsable de l'activité de ces protéines.

4.3.4 Utilisation de drogues

Une autre approche, pour dissocier l'effet de la polymérisation d'actine de l'activation des myosines, consiste en l'utilisation de drogues qui bloquent sélectivement la voie ROCK et la voie associée aux formines. De cette manière, nous souhaitons voir s'il est possible respectivement, de générer des forces en l'absence de myosines actives et de relocaliser les myosines en l'absence de réarrangement d'actine

Bloquer la kinase ROCK

Pour bloquer les myosines, deux drogues principales sont utilisées : la Blebbistatine et le Y27632. D'après la littérature, l'utilisation de Y27632 (à 20 μ M) inhibe l'activité de la kinase ROCK, ce qui d'après nos observations entraîne des modifications phénotypiques importantes (Figure 4-26).

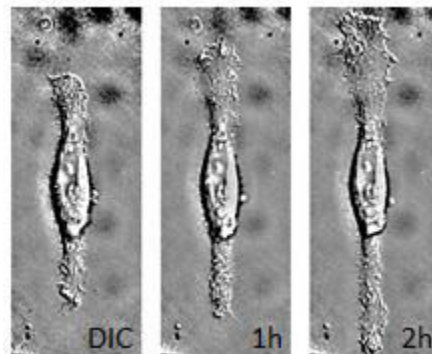


Figure 4-26 Effet de Y27632 sur une cellule HeLa déposée sur un patron de fibronectine en ligne. Images DIC avant (gauche) ainsi que 1h (milieu) et 2h (droite) après l'ajout de Y27632 à 20 μ M. Hauteur des images : 130 μ m.

En effet, des cellules initialement déposées sur des patrons de fibronectine en forme de lignes s'étalent fortement lorsque leur contractilité est bloquée avec cette drogue. Pour bloquer cet effet, les cellules ont été préalablement déposées sur des patrons de fibronectine ronds de 50 μ m de diamètre, puis la drogue a été ajoutée aux cellules et 2 heures leurs ont été laissées pour s'y habituer. Ensuite, en créant un recrutement local de ARH, nous observons toujours la polymérisation d'actine, mais plus de rétraction des cellules (Figure 4-27). C'est la preuve que l'activité de la voie ROCK est nécessaire dans ces conditions pour créer de la rétraction.

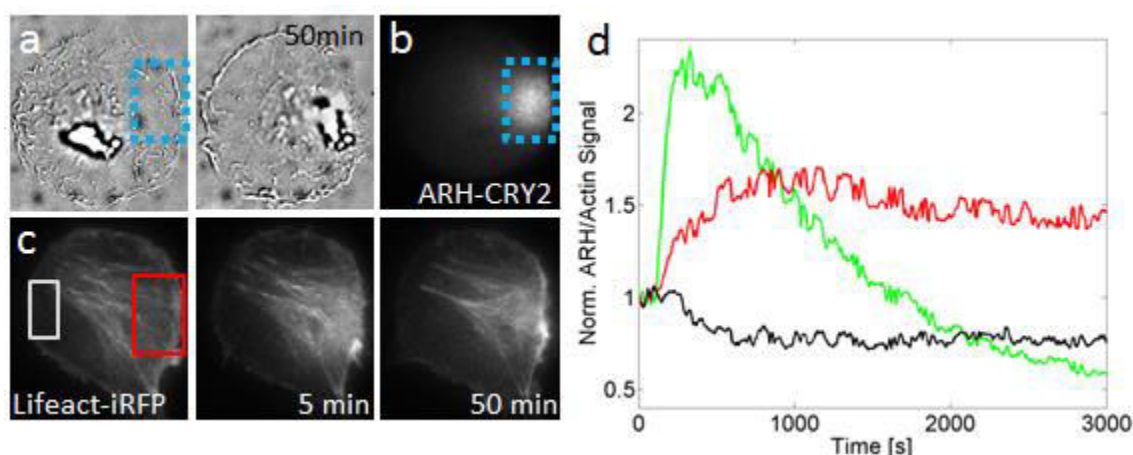


Figure 4-27 : Effet de Y27632 lors d'un recrutement de ARH sur cellule HeLa. (a) Images DIC d'une cellule déposée sur un patron rond de fibronectine avant et 50 minutes après le début des activations. La région d'activation est la région en pointillés bleus. (b) Signal TIRF de ARH 10 minutes après le début des activations. (c) Images TIRF de Lifeact avant ainsi que 6 et 50 minutes après le début des activations. (a-c) Hauteur des images : 60 μm . (d) quantification de l'actine dans la région rouge et la région blanche de (c).

Bloquer les myosines

Nous avons testé, par ailleurs, l'effet de la Blebbistatine, qui doit bloquer directement l'action des myosines II. Ces expériences n'ont pas été concluantes et ce pour deux raisons. La première est que la Blebbistatine formait des clusters de molécules, ce qui modifiait probablement son efficacité et la seconde est que la Blebbistatine est sensible à la lumière. Cette sensibilité dans le bleu, en particulier aux longueurs d'ondes utilisées pour effectuer la photoactivation, dégrade cette drogue. Dans le cas où un mouvement de membrane aurait été créé malgré la présence de cette drogue, nous ne pourrions conclure si cet effet serait dû à une autre protéine activée par ROCK ou bien à une malfunction de cette drogue.

Bloquer les formines

L'utilisation de drogues, en particulier SMIFH2, aurait pu démontrer que la polymérisation d'actine implique effectivement l'action des voies formines - cette drogue étant reconnue pour sa capacité à bloquer cette voie de signalisation. En l'incubant avec les cellules, et en faisant une photoactivation de ARH-CRY2, nous aurions pu conclure sur l'importance relative de cette voie. Cependant, après l'avoir utilisée à des concentrations allant de 30 nM à 150 nM, il est apparu qu'à faible concentration, elle ne bloquait pas la polymérisation d'actine - ou que de l'actine était toujours polymérisée par une voie parallèle - et qu'à dose plus importante, elle modifiait trop l'intégrité de la cellule.

Fixer le cytosquelette d'actine

Enfin, nous aurions souhaité comprendre si l'enrichissement en myosine II est un phénomène passif, dû à un enrichissement en actine, ou bien s'il est provoqué par l'action seule

de ROCK. Il a été récemment publié un mélange de drogues dont l'utilisation fige le cytosquelette d'actine de manière stable (106). Ainsi nous aurions pu faire varier l'activité de myosine II, en recrutant ARH, tout en conservant un cytosquelette identique. En pratique, j'ai utilisé un mélange de Jaspakinolide et de Latrunculine B - sans le troisième constituant, qui était du Y27632 et qu'il était impossible de rajouter dans le contexte de cette expérience. Même en diminuant les concentrations par rapport à ce qui avait été reporté, il est apparu que ces drogues abîment trop le cytosquelette sur les échelles temporelles qui nous intéressent - de l'ordre de l'heure.

Il semble que le couplage de l'utilisation de drogues à l'outil optogénétique nécessite soit l'utilisation d'un autre type cellulaire que des cellules HeLa soit une calibration beaucoup plus minutieuse des concentrations à utiliser.

Nous avons démontré la nécessité de l'activité de ROCK pour générer de la contraction à partir de l'activité des myosines. Il pourrait cependant être intéressant de regarder la localisation de l'actine et des myosines en même temps lors du traitement avec Y27632. L'utilisation du plasmide ARH-CRY2- Δ (mCherry) avec cette drogue nous permettrait de comprendre si le recrutement des myosines est dépendant de ROCK ou bien seulement de l'actine.

4.4 Résumé

Durant une polarisation induite par l'activation de Cdc42 et RhoA, l'organisation spatiale des points focaux d'adhésion évolue.

Le recrutement local de ARH augmente les contraintes locales subies par les points focaux, tandis qu'à l'opposé de la zone de recrutement, de nouvelles adhésions sont créées, celles-ci étant immédiatement intégrées au cytosquelette des cellules.

Une activation locale de RhoA entraîne une polymérisation d'actine dont le niveau dépend du niveau du recrutement.

Le modèle linéaire théorique reliant recrutement de ARH et polymérisation d'actine reproduit très correctement les résultats expérimentaux pour des valeurs spécifiques des paramètres $\{k_{act}, k_{off}\}$. La valeur du paramètre k_{off} dépend peu du type d'activation et est relative à des temps caractéristiques de disparition d'actine de l'ordre de 3 minutes.

La disparition d'actine correspond à l'intégration de plusieurs niveaux de signalisation le long du réseau associé à RhoA, elle n'est pas uniquement due au turnover de l'actine et n'est pas directement reliée à la désactivation de RhoA.

En théorie et en pratique, une polymérisation d'actine locale entraîne une dépolymérisation d'actine à longue distance.

Un recrutement local de ARH entraîne un enrichissement en myosines avec une dynamique plus lente que les recrutements d'actines. Sans leur activité lié à ROCK, les cellules polymérisent toujours de l'actine mais ne créent plus de rétraction.

Chapitre 5 Discussion et perspectives

Durant cette thèse, nous avons étudié les propriétés du système optogénétique CRY2/CIBN qui, lorsqu'il a été publié, semblait prometteur bien que ses caractéristiques précises n'étaient pas connues. Depuis, la connaissance des caractéristiques de ce système a permis de comprendre les limites de celui-ci. Dès lors, en le couplant à des activateurs de RhoGTPases, nous avons réussi à contrôler de manière quantitative l'organisation interne locale des cellules et à modifier leur polarité globale.

Dans ce chapitre, nous allons aborder les résultats obtenus au regard de la biophysique du système et de l'analyse des réseaux de signalisation. Nous verrons que ces approches peuvent être généralisées à des systèmes optogénétiques voisins, aux caractéristiques physiques et biologiques comparables mais différentes. Nous aborderons également l'intérêt de contrôler la polarisation de cellules pour comprendre :

- l'implication de protéines spécifiques,
- le rôle de la polarité initiale,
- la dynamique de sa modification globale.

Nous verrons ensuite les améliorations envisageables pour ce système pour améliorer notre capacité à disséquer des processus biologiques impliqués dans la migration cellulaire, que cela soit au niveau du système CRY2/CIBN lui-même, au niveau du dispositif de microscopie utilisé ainsi que au niveau de notre approche globale de la perturbation des réseaux de signalisation.

Nous concluons enfin par les perspectives associées à notre approche couplant optogénétique et réponse des systèmes. Il semble, en effet, que cet outil optogénétique activateur des RhoGTPases Cdc42, Rac1 et RhoA puisse être implémenté à très court terme dans de nombreux domaines de la biophysique impliquant, ou non, la polarité cellulaire.

5.1 Conclusion

5.1.1 Transposition de la méthode

Dans cette thèse nous avons, dans un premier temps, étudié précisément les propriétés du système CRY2/CIBN. Nous avons vérifié que les processus de diffusion dans le cytoplasme, de diffusion à la membrane et de dissociation envisagés étaient en accord avec les observations expérimentales. Nous avons ensuite caractérisé précisément ces paramètres, ce qui a permis de comprendre les limites de ce système et la manière de le contrôler quantitativement.

Longueur caractéristique

Nous avons montré qu'il est possible, en changeant la fréquence des activations, de choisir la quantité de protéines recrutées dans la région d'intérêt sans avoir besoin de boucle de rétroaction sur le signal observé. Par ailleurs, bien que la dissociation du complexe ne soit pas contrôlée par la lumière, nous avons contrôlé la distribution spatiale de CRY2 en tenant compte de la longueur caractéristique intrinsèque de ce système : $\lambda = \sqrt{D/k_{diss}}$.

Cette approche reste vraie dans d'autres systèmes optogénétiques et peut être réutilisée en tenant compte des différences entre systèmes. Par exemple, dans le cas de PA-Rac (Figure 1-30), les protéines diffusent à la membrane, sont activées en présence de lumière, et sont désactivées après un temps caractéristique d'activité. Le phénomène de dissociation dans CRY2/CIBN est remplacé ici par un phénomène de désactivation avec un taux $k_{désa}$, mais il doit être possible d'obtenir des activations de Rac1 de longueur caractéristique de l'ordre de $\lambda = \sqrt{D/k_{désa}}$.

Utilisation des domaines DHPH

Dans un second temps, nous avons généralisé une approche présentant l'utilisation des domaines DHPH des GEF pour activer des RhoGTPases spécifiques. De cette manière, il est possible d'activer ces protéines de manière directe, sans jouer sur l'activité de protéines en amont dans la chaîne de signalisation – telles que des récepteurs membranaires. De plus, en activant la réserve endogène de RhoGTPases, nous sommes sûrs de toujours travailler avec un nombre biologiquement pertinent de molécules actives, à la différence, par exemple, d'une surexpression de RhoGTPases.

Cette approche n'est pas limitée aux trois RhoGTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 mais est applicable à d'autres RhoGTPases fonctionnant sur les mêmes principes. Il existe en effet chez les mammifères plus de vingt RhoGTPases et plus de cinquante GEF différentes dont les propriétés sont encore mal connues. Cet outil doit permettre une meilleure compréhension des relations entre GEF et RhoGTPases et peut, de plus, être utilisé pour recruter des GAP - qui

forcent la désactivation des RhoGTPases localement. Il est parfaitement utilisable également pour contrôler des processus plus complexes, associés au recrutement d'une protéine possédant un domaine GEF d'une RhoGTPase et GAP d'une autre, par exemple.

Cette approche utilisant les domaines DHPH n'est pas limitée à un recrutement optogénétique. Ces domaines DHPH, greffés sur des billes magnétiques (83) manipulées à l'aide d'un aimant, dans différentes parties des cellules, créent localement de l'activité cellulaire. Cette approche n'est pas identique à l'approche optogénétique mais plutôt complémentaire. En particulier, elle crée des recrutements sur des échelles spatiales plus petites (entre 40 et 200 nm) et permet une parallélisation massive des expériences grâce à l'utilisation de lamelles micro-fabriquées (>100 cellules en parallèle)(107). Cependant, au contraire de l'optogénétique, ces systèmes ne sont pas génétiquement implémentés, ils nécessitent l'injection des particules magnétiques dans les cellules et ne permettent pas le contrôle précis de la perturbation au cours d'une même expérience.

5.1.2 Plateforme pour l'étude de la polarité

Polarisation d'une cellule

Nous avons présenté, dans cette thèse, les changements phénotypiques relatifs à une activation locale de RhoGTPase. Que ce soit dans le cas de Cdc42 ou de RhoA, aucune de ces expériences n'a été en contradiction avec les derniers développements publiés dans le domaine des RhoGTPases. De plus, tous les phénotypes créés avaient déjà été observés, comme dans le cas de la protrusion avant qui entraîne l'arrière (108), et le cas de l'arrière d'une cellule qui en se contractant crée une protrusion à l'avant (109)(110). Nous créons donc des perturbations qui sont biologiquement pertinentes.

Les premières expériences présentées ont permis d'observer le déroulement temporel de cette polarisation à partir d'un état initial non polarisé. Par la suite, nous avons regardé précisément le rôle de protéines clés quant à leur implication dans la contraction cellulaire. Les résultats de nos expériences sont en accords avec les rôles observés par la communauté scientifique. Ainsi, les vinculines, l'actine et les myosines sont impliquées à travers leur organisation et leur activité lors d'une activation locale de RhoA. Il semble en particulier que les vinculines fassent le lien entre le substrat des cellules et leur cytosquelette et que ce cytosquelette - en particulier l'actine - soit le support nécessaire aux myosines pour générer la contraction des cellules.

Dans le cadre de ces expériences, il serait intéressant de tester la dynamique des autres régulateurs de la polarité cellulaire, comme nous l'avons fait sur l'exemple du réseau actomyosine. Il faudrait, par exemple, observer la réorientation des positions relatives du noyau, du centrosome et de l'appareil de Golgi (111), qui sont des éléments importants de la polarité

cellulaire globale. Il faudrait, de plus, regarder la dynamique des microtubules pour savoir s'ils sont impliqués directement dans ce type de processus (112)(26).

Nous avons établis durant ces expériences des courbes de réponse moyennées sur cinq cellules. En augmentant notre échantillon pour chacune des RhoGTPases, il est possible de créer des courbes de référence qui seraient utiles par la suite à la recherche de comportements singuliers. Trois classes de modifications cellulaires peuvent alors être testées :

- l'utilisation de drogues,
- les mutations génétiques,
- la suppression de gènes.

En comparant les courbes obtenues lors de ces modifications à celles de référence, il est alors possible de mesurer l'efficacité d'une drogue, l'importance d'une mutation ou d'un gène vis-à-vis de la polarisation dans le cas de ces RhoGTPases.

Le dernier point que nous avons soulevé est la régulation de l'activité des RhoGTPases sur des distances de l'ordre de la vingtaine de micromètres. Ce problème n'est toujours pas compris, mais l'optogénétique, couplés avec l'observation de l'activité des RhoGTPases, des modifications de la tension membranaire ou l'observation des flux de cytosol devraient y répondre.

Inversion de polarité cellulaire

L'utilisation de patrons de fibronectine en double arbalète couplée avec l'optogénétique s'est révélé être un outil d'intérêt. Ils génèrent une polarité cellulaire initiale robuste qui n'est pas modifiable naturellement. En activant des RhoGTPases à l'inverse de la polarité existante et en étudiant systématiquement la manière dont les cellules se réorganisent, à l'aide d'effecteurs fluorescents, nous pouvons quantifier les modifications moléculaires nécessaires au changement de polarité.

Avec ce système, il devrait être possible de mesurer les conditions nécessaires et suffisantes pour que les cellules réussissent à passer d'un patron à un autre, en termes de distribution spatiale et temporelle de GEF recrutée. Comme dans le cas de la polarisation sans polarité initiale, il serait alors possible de combiner cette approche à des modifications génétiques sur des protéines dont l'implication dans la polarité cellulaire est supposée. Les variations relatives aux conditions suffisantes pour le changement de polarité pourraient alors donner des indices sur l'importance relative de ces protéines.

En comparant les résultats obtenus avec ceux pour des cellules sans patron, il serait possible de quantifier l'effet de la polarité initiale des cellules ce qui devrait permettre, en

particulier, de comprendre si, dans ce type de problème, le paramètre important est le nombre de protéines recrutées ou bien la différence entre le nombre de protéines à chacun des pôles.

J'ai présenté ici les résultats obtenus sur un type de patron - les doubles arbalètes - dont les caractéristiques en termes de forme, de concentration en fibronectine et d'aire d'adhésion sont fixées. Mais il serait intéressant de changer ces paramètres et ainsi modifier le niveau de l'état de transition et la stabilité des deux positions d'équilibre. En effet, il doit être possible d'augmenter ou diminuer la difficulté de passer d'un patron à l'autre en modifiant la concentration de fibronectine à forme fixée, ou bien en modifiant la forme du patron à aire d'adhésion constante (113). Les changements observés concernant les conditions suffisantes à la transition d'un patron à un autre seraient alors à relier aux nouvelles contraintes mécaniques qui s'appliquent sur les cellules.

5.1.3 Analyse intégrée de la réponse d'un réseau de signalisation

Lors de l'analyse du lien entre recrutement de ARH et polymérisation d'actine, nous avons observé que la connaissance des détails moléculaires de toutes les étapes intermédiaires, n'était pas indispensable à la description du phénomène. Ainsi, le *turnover* de l'actine n'est pas une donnée importante du problème, il faut davantage considérer l'ensemble comme un module dont la fonction est de polymériser de l'actine à partir de l'activation de RhoA. Le modèle d'interaction que nous avons développé reproduit correctement les résultats à partir de deux grandeurs dynamiques seulement : un taux de polymérisation d'actine à partir d'une concentration de ARH recrutée et un taux de disparition de l'actine. Ces paramètres ont été obtenus à partir de nos expériences et peuvent reproduire des recrutements complexes – tels que les recrutements à deux marches. Maintenant que cette approche a été validée, il faudrait se pencher sur l'influence sur ces paramètres du contexte cellulaire initial.

Ces analyses ne sont pas limitées à la voie de signalisation impliquant RhoA. Il serait intéressant de regarder leur valeur dans le cas de la polymérisation/dépolymérisation d'actine associée aux voies Cdc42 et Rac1. La comparaison de ces paramètres pour les différentes RhoGTPases pourrait ainsi améliorer notre compréhension des différentes dynamiques de régulation en jeu.

Cette approche n'est pas non plus restreinte aux voies des RhoGTPases mais est applicable à n'importe quel réseau de signalisation. Il suffit pour cela de pouvoir contrôler la perturbation et quantifier la perturbation. Cette quantification n'étant pas restreinte à une mesure de fluorescence mais pouvant être n'importe quel changement de phénotype quantifiable, tel que l'activité membranaire, le déplacement de la cellule ou d'une de ses structures internes. Si nous ajoutons à cela un modèle d'interaction, il est possible d'extraire du système les paramètres dynamiques décrivant son agencement. Ces paramètres peuvent nous donner des informations,

par exemple, sur le nombre d'intermédiaires entre la perturbation et la réponse et la linéarité du système, mais aussi permettre de déterminer quelles sont les perturbations qu'il faut effectuer pour obtenir un état qui n'a jamais été observé précédemment.

5.2 Amélioration du contrôle de l'activité des RhoGTPases

5.2.1 Modification du système CRY2/CIBN

Nous avons vu dans cette thèse que le système optogénétique CRY2/CIBN possède des caractéristiques permettant d'atteindre une résolution spatiale de 5 μm et une résolution temporelle de l'ordre de 5 secondes pour créer la perturbation et de 3 minutes pour qu'elle disparaisse. Cependant, nous pourrions être amenés à vouloir changer ces valeurs. Diminuer la taille caractéristique serait important, par exemple, pour travailler avec des cellules de taille inférieure à des cellules HeLa. Diminuer le temps caractéristique de dissociation serait important également pour créer des perturbations périodiques de période plus courtes que 180 secondes.

Résolution temporelle

Pour améliorer la résolution temporelle, il s'agit de diminuer le temps de dissociation du complexe. Pour ce faire, il faut trouver des mutations des protéines CRY2 et/ou CIBN qui diminuent le temps d'interaction de ces protéines. Les expériences réalisées seraient alors les mêmes que celles effectuées précédemment, il faudrait simplement adapter la fréquence d'activation en tenant compte de la disparition plus rapide de la perturbation.

Résolution spatiale

Pour augmenter la résolution spatiale, deux paramètres sont modifiables. Le premier est la taille caractéristique λ qui dépend de la racine carrée de D/k_{off} . Ce paramètre est modifiable en changeant soit le temps caractéristique d'interaction, soit la valeur du coefficient de diffusion. En pratique, pour diminuer λ , il faudrait diminuer D en augmentant le nombre de domaines d'interaction avec la membrane, par exemple, ou bien en créant une fusion entre CIBN et une protéine membranaire spécifique diffusant moins vite.

Si nous parvenons à diminuer λ jusqu'à une taille de l'ordre du micromètre, un deuxième phénomène limitera la résolution spatiale : la diffusion cytoplasmique de CRY2-mCherry dans le cytoplasme. En effet, cette diffusion crée un signal initial d'une largeur de l'ordre de la mi-hauteur de la cellule, soit en pratique 3-4 μm . Il est possible d'annuler cet effet en inversant le système, c'est à dire avoir CRY2 initialement fixé à la membrane repéré par une protéine GFP et CIBN dans le cytoplasme fusionné avec une protéine mCherry (Figure 5-1, b). En collaboration avec l'équipe de Xavier Morin à l'Institut de biologie de l'Ecole Normale Supérieure, nous avons tenté différentes stratégies pour inverser le système en changeant le type d'ancre membranaire et la distance séparant les différentes protéines, en vain. Les deux protéines sont bien exprimées par les cellules, respectivement à la membrane et dans le cytoplasme, mais aucun

recrutement n'a été observé. Depuis, cette impossibilité à inverser le système a par ailleurs été évoquée par d'autres chercheurs (76).

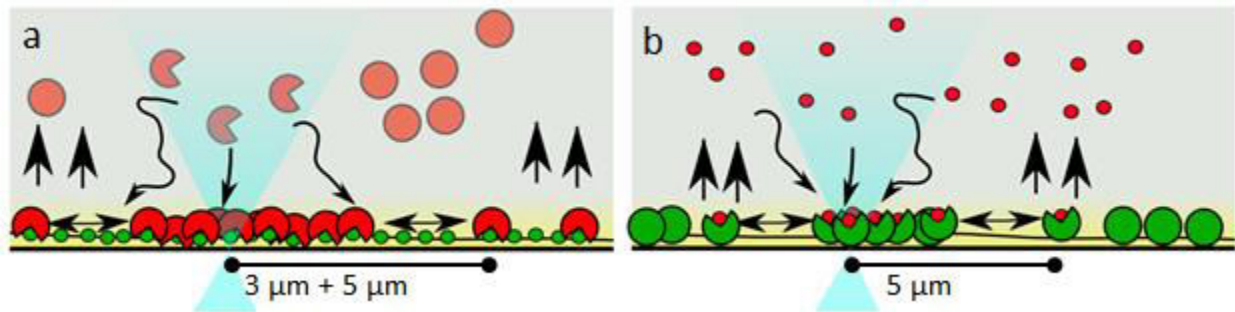


Figure 5-1 : Schéma du système CRY2/CIBN (a) et de sa version inversée (b) permettant de contourner l'effet de la diffusion cytoplasmique.

CRY2/CIBN et mitose

Un autre point à comprendre et à améliorer est la possibilité de faire fonctionner ce système en mitose. Nous n'avons pas encore réussi à en déterminer la raison exacte, mais ce système fonctionne, en effet, moins bien lors de la division cellulaire. Les gènes codant le système CRY2/CIBN, extraits du génome d'une plante, n'étant pas présents chez les cellules mammifères, il est difficile d'envisager la raison pour laquelle l'efficacité des recrutements puisse varier en fonction du cycle cellulaire. Il semble cependant que CRY2 possède des protéines homologues chez les mammifères impliquées dans des cycles circadiens (114), elles possèdent donc potentiellement un rôle différent durant les différentes périodes du cycle cellulaire. Il a été possible de faire fonctionner ce système dans des cellules en division dans le cas particulier où les cellules expriment une très grande quantité de CRY2. L'explication que nous proposons est que CRY2 interagit avec un facteur de transcription nucléaire qui est relâché dans le cytoplasme au moment de l'ouverture de la membrane nucléaire et qui titre CRY2. Il s'agit donc, pour faire fonctionner ce système dans ces conditions, de travailler avec des grandes quantités de CRY2 exprimées par les cellules. Une solution à long terme serait de réussir à déterminer le facteur de transcription avec lequel CRY2 interagit et de trouver une mutation dans CRY2 qui empêche cette interaction.

5.2.2 Amélioration de l'approche

Contrôle de l'activation

Le module de FRAP utilisé pour photoactiver CRY2 permet de dessiner précisément la zone à illuminer. Cependant, cette illumination active des protéines CRY2 dans tout le cône de lumière du laser focalisé, ce qui augmente la taille de recrutement effective. Un autre inconvénient de ce système de microscopie est son incapacité à moduler l'intensité envoyée sur les différents points de la zone dessinée, ce qui nous empêche de créer des gradients spatiaux

d'illumination, par exemple. Pour répondre à ces deux problèmes, il a été développé au laboratoire un microscope basé sur la technologie DLP (*Digital Light Processing*), technologie utilisée couramment dans les vidéoprojecteurs. Le principe est le même que le microscope commercial *Mosaic* (ANDOR), utilisé dans l'article (69). Il se base sur l'utilisation d'une cellule de 608*684 micro miroirs de 7,6 μm de taille caractéristique, orientables indépendamment à 4 kHz dans deux directions particulières. En éclairant ces miroirs avec de la lumière bleue, et en faisant l'image de cette cellule de miroirs dans le plan objet du microscope, il est possible d'illuminer les cellules avec n'importe quel type de patron de lumière. En modifiant la proportion du temps que les différents miroirs restent dans une position, nous contrôlons l'intensité lumineuse envoyée sur les différents points de la lamelle. Cette technique permet alors de projeter à 120 Hz des images possédant une résolution de 8-bit (256 niveaux de gris). Par ailleurs, la lumière arrivant sur l'entrée de l'objectif n'étant pas collimatée, cela diminue la résolution de la taille minimale du spot mais permet d'avoir un cône de lumière moins divergent ce qui permet d'activer moins de CRY2 à l'extérieur de la région d'intérêt (115).

Quantification du recrutement

Toutes les mesures de fluorescence effectuées dans cette thèse ont pour unité une unité arbitraire qui dépend des caractéristiques de l'imagerie (gain de la camera, puissance laser, temps d'exposition, profondeur de pénétration du TIRF) alors que nous souhaitons faire ces quantifications en nombre absolu de protéine. Il faut donc trouver une manière de calibrer le système.

Deux approches différentes de ce problème sont envisageables. La première technique serait l'utilisation de patrons sur des lamelles fonctionnalisées avec une concentration surfacique connue de protéines fluorescentes. En comparant leur fluorescence à celle des cellules déposées sur des patrons voisins, il serait alors possible de déterminer le nombre de protéines recrutées dans ces cellules. Un des inconvénients de cette technique est que les protéines fluorescentes sur la lamelle ne sont pas dans un milieu possédant les mêmes caractéristiques ioniques que celles intracellulaires, ce qui en modifie les caractéristiques de fluorescence.

La deuxième méthode consiste à regarder la courbe de photoblanchiment d'une cellule au cours du temps (Figure 5-2). Dans le régime où toutes les molécules sont photoblanchies, certaines récupèrent aléatoirement leur fonctionnalité et peuvent être excitées à nouveau. Nous observons alors la fluorescence de molécules uniques ce qui détermine le rapport entre fluorescence et nombre de molécules (116). Si les paramètres d'imagerie ne changent pas, alors ce rapport reste constant au cours du temps sur des cellules voisines de celle testée. Ce type de mesure pourrait être réalisé en particulier à la fin de chaque film, quand les cellules ne sont plus utiles

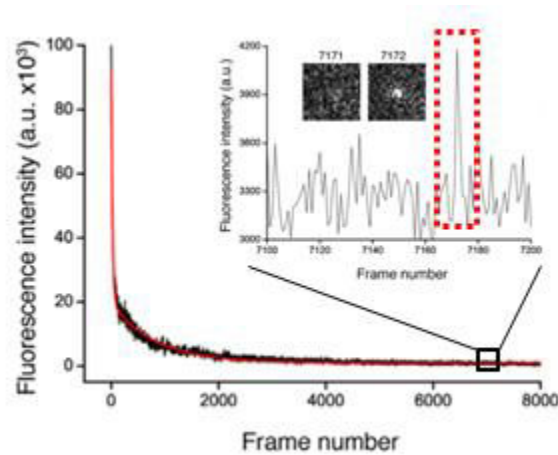


Figure 5-2 : Quantification de la relation entre fluorescence et nombre de protéines. Graphique représentant la décroissance du signal fluorescent due au photoblanchiment. Dans le régime complètement noir (au-delà de l'image 4000), il est possible de voir apparaître des pulses d'intensités (mis en avant par le carré en pointillés rouges) relatif à la fluorescence d'une protéine unique. Images adaptées de (116).

Lignée cellulaire

Les expériences présentées dans cette thèse sont basées sur la lignée cellulaire HeLa qui a été principalement choisie pour une raison : le fait que ces cellules sont relativement faciles à transfecter. C'était en effet très important lors des expériences préliminaires de choix et de caractérisation du système optogénétique. Par ailleurs, il n'y a pas de raison pour que la biophysique du système CRY2/CIBN dépende du type cellulaire, les coefficients de diffusions membranaire et cytoplasmique et le temps caractéristique de dissociation sont probablement très proches des cellules HeLa aux fibroblastes. Concernant la facilité de transfection, l'utilisation de ces cellules est importante également lors des expériences où il faut transfecter quatre plasmides en parallèle, ce qui n'est pas évident dans tous les types cellulaires.

Cependant, il aurait été intéressant d'utiliser plus largement des cellules dont les propriétés de migration ont été plus largement établies tels que les fibroblastes NIH3T3. La limitation principale à l'utilisation de ces cellules est la très faible efficacité de transfections obtenue, de l'ordre de 3 pourcent des cellules (en comparaison à 40 pourcent pour des HeLa). La solution envisagée est alors de créer des plasmides lentiviraux. Les cellules seraient alors infectées au lieu d'être transfectées, ce qui devrait avoir une meilleure efficacité. Par ailleurs, l'ADN sera mieux intégré dans le génome et la création de lignées cellulaires stables sera plus facile. De cette manière, il serait possible d'activer localement les RhoGTPases dans des fibroblastes, ce qui permettrait de rechercher des phénomènes tels que la persistance (117) lors de la création de mouvement des cellules – que nous n'avons pas observés dans les HeLa.

Cette étude se basant sur les cellules HeLa a par ailleurs révélé des éléments très intéressants. Il est apparu que ces cellules, à l'activité et à la mobilité naturelle très réduites,

s'organisent très différemment lorsque l'activité de leurs RhoGTPases est forcée. Les phénotypes que nous avons observés sont en effet très proches de ceux de cellules migrantes.

5.3 Perspectives

Une partie de cette thèse a été consacrée à la caractérisation de l'outil optogénétique en lui-même et à la vérification de sa capacité à activer les voies de signalisation associées à Rac1, Cdc42, et RhoA. Ces plasmides, utilisés dans le cadre de l'étude de la polarité à l'échelle de la cellule unique, peuvent avoir une utilité bien au-delà de ce domaine.

Que cela soit lors de discussions de couloir à l'Institut Curie ou bien au cours des séminaires et conférences auxquels j'ai pu assister et participer, il est apparu que cette approche pourrait avoir un intérêt à très court terme dans un grand nombre de domaine de la biophysique.

Pour conclure cette thèse, je vais donc introduire quelques expériences pour lesquelles l'utilisation de cette approche associant optogénétique et analyse quantitative pourrait être profitable.

5.3.1 In vitro

In vitro, il est possible de mettre en solution tous les composants pour polymériser des microtubules par exemple. Désormais, les chercheurs sont même capables de créer des vésicules sur lesquelles ils greffent et polymérisent de l'actine (Figure 5-3, a)(118). Cependant, les phénomènes régissant la répartition des protéines dans ces systèmes sont la diffusion et les réactions chimiques. Ces phénomènes interviennent de manière homogène et ne sont contrôlés que par la concentration des différents éléments en solution. Il existe quelques méthodes qui permettent d'effectuer des perturbations locales telles que l'utilisation de micropipettes ou de dispositifs de microfluidique, cependant elles ne sont pas précises et créent souvent des flux.

Dans ce cas, l'utilisation de l'optogénétique serait hautement profitable quant à la création d'événements locaux. Il devrait être possible, en particulier, de reconstituer des systèmes dans lesquels l'activité des myosines et/ou la polymérisation d'actine puisse être forcée - avec ARH et ITSN par exemple. Il faudrait simplement purifier ces protéines ainsi que CIBN-GFP et créer des vésicules enrichies en CIBN. De cette manière, il serait alors possible de recruter localement ITSN sur ces vésicules. Si le réservoir est de plus enrichi en actine, par exemple, ainsi qu'en tous les constituants nécessaires à la polymérisation d'actine via la voie cdc42 et Arp2/3, il serait alors possible de polymériser de l'actine au contact avec la membrane de la vésicule (Figure 5-3, a). Nous pourrions alors étudier l'effet, sur la forme de cette vésicule, d'une distribution non homogène d'actine. Cette répartition asymétrique pouvant également reproduire le phénotype de vésicules qui sont poussées par une comète d'actine branchée (118)(119).

Il est possible, par ailleurs, de tirer des tubes de membrane à partir de telles vésicules et de mesurer les forces s'exerçant dessus (Figure 5-3, b)(120). Le recrutement de ARH, à la membrane, dans ces tubes, en présence des composants nécessaires à l'activation des

myosines, permettrait l'observation des composants nécessaires et suffisants pour créer de la contractilité. En modifiant alors de manière contrôlée le nombre de protéines activées, il serait possible de regarder l'influence du nombre de myosine sur la force exercée.

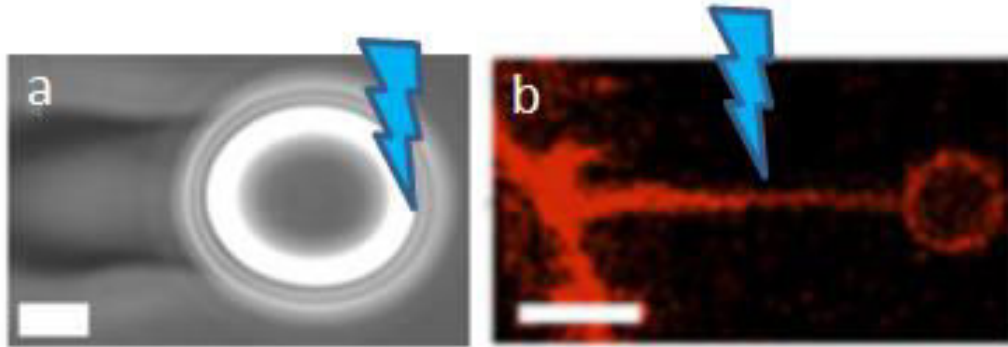


Figure 5-3 : (a) Image adaptée de (119) d'une vésicule entourée d'un nuage d'actine dont la brisure de symétrie lui permet d'être propulsée vers la droite. Forcer la polymérisation d'actine sur cette vésicule avec de la lumière pourrait contrôler la brisure de symétrie et guider le déplacement de cette vésicule. (b) Image adaptée de (120) d'un filopode tiré d'une vésicule par une bille contrôlée avec un dispositif de pince optique. Illuminer cette structure pourrait modifier l'activité des myosines et ainsi changer la force appliquée dessus.

5.3.2 Cellule unique

Concernant l'étude des cellules uniques, plusieurs éléments pourraient être rapidement testés à partir de ces plasmides. Il a récemment été prouvé (121) la possibilité de mesurer les forces exercées par une cellule ou un tissu sur un substrat à partir du déplacement de billes fluorescentes à l'intérieur de ce substrat (Figure 5-4). Cette technique appelée *Traction Force Microscopy* (TFM), couplée à un recrutement optogénétique mesurerait les forces exercées par l'activation locale et globale des RhoGTPases, en fonction de leur concentration.

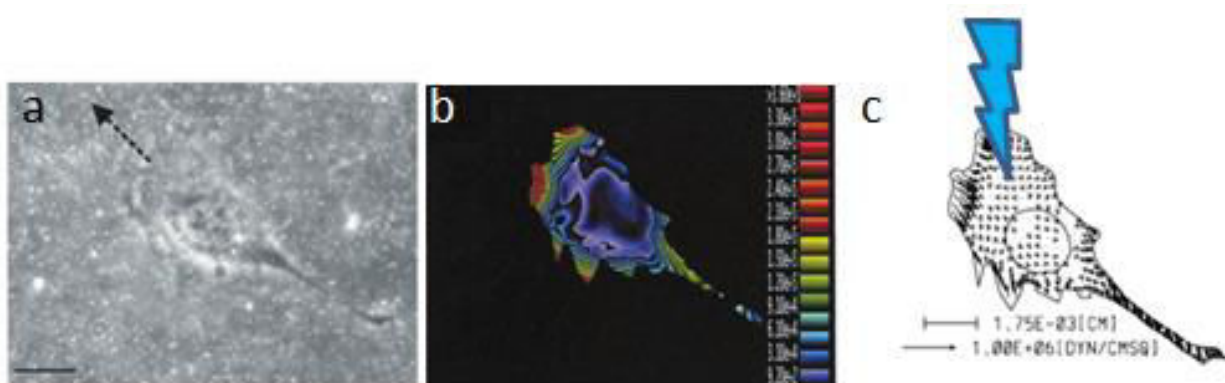


Figure 5-4 : (a-c) Images adaptées de (121), présentant le principe de la TFM. (a) Image de fluorescence des billes contenues dans le gel sur lequel se déplace la cellule. (b) Carte de la valeur des forces en fonction de la position sur la lamelle. (c) Orientation et amplitude des forces mesurées exercées par la cellule. Contrôler les RhoGTPases dans ces cellules permettrait d'avoir accès à la valeur des forces qu'elles génèrent.

Durant ma thèse, seule la migration des cellules adhérentes a été considérée. Cependant ce n'est pas la seule stratégie de déplacement employée par les cellules, en effet, dans le cas de

surface non adhésive, certains type cellulaire migrent en créant des blebs (122)(123). Dans ces systèmes l'activité de contraction et la polymérisation du cortex d'actine jouent un rôle primordial et sont contrôlés en amont par les niveaux d'activité globale et locale des RhoGTPases. Il serait donc très intéressant d'implanter l'outil optogénétique dans ces cellules pour contrôler la dynamique de ces blebs et ainsi comprendre ce type de motilité (124).

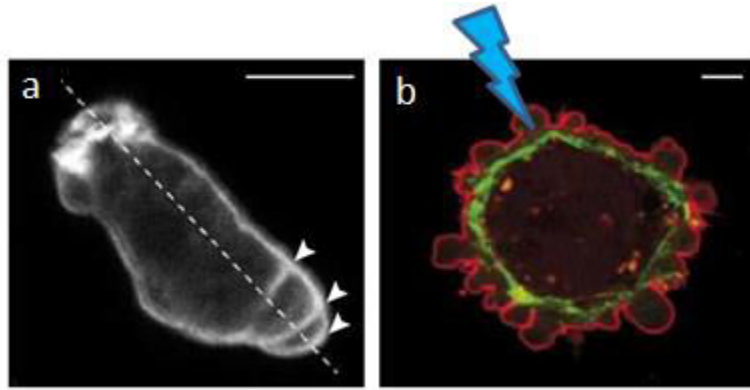


Figure 5-5 : (a, b) Images adaptées de (122) présentant la formation de blebs chez *Dictyostelium discoideum* (a) et dans des cellules de type M2 (b) où les myosines sont représentées en vert et la membrane en rouge. Contrôler la contractilité locale de ces blebs avec ARH pourrait en modifier la dynamique et diriger la migration de ces cellules.

L'outil optogénétique étant non invasif et utilisable avec de la microscopie biphotonique (70), nous pourrions l'utiliser non plus sur des cellules se déplaçant sur des lamelles mais pour contrôler la motilité cellulaire dans un contexte biologique intégré. Utilisée sur des cellules dans un environnement à trois dimensions suffisamment transparent pour laisser passer la lumière, cette approche spécifierait dans quelle mesure les processus biologiques démontrés sur lamelle restent vrais à trois dimensions (125)(126)(127).

5.3.3 Tissus reconstitués

Les enjeux associés à la régulation de l'activité des cellules à l'échelle d'un tissu sont très différents de ceux des cellules uniques. Cependant, c'est parfois l'action de quelques cellules uniques qui guide le comportement global d'un tissu. C'est en particulier le cas pour le phénomène de *wound healing* (cicatrisation de plaies) où il a été observé la présence de cellules fibroblastes NIH/3T3 leaders qui entraînent avec elles un grand nombre de cellules pour former une protrusion (Figure 5-6, a)(8). Il serait intéressant d'essayer de créer ce type de phénotype avec l'outil optogénétique pour comprendre s'il est dû à l'action des RhoGTPases – de par leur concentration ou leur répartition - ou bien s'il possède une origine autre.

A l'échelle du tissu, dans le cas de la gastrulation chez la drosophile par exemple, il a été observé que les tissus sont contractés de manière périodique (6)(7). L'utilisation de ARH pour activer de manière périodique RhoA dans des tissus suspendus (Figure 5-6, b) permettrait de reproduire ce type de phénomène et de regarder l'effet sur l'organisation interne des cellules

elles-mêmes. Par ailleurs, cette approche, couplée à une mesure des forces appliquées par le tissu (128) permettrait de valider que ces oscillations permettent de créer des niveaux au moins égaux, voire supérieurs, à ceux créés par une contraction continue (129).

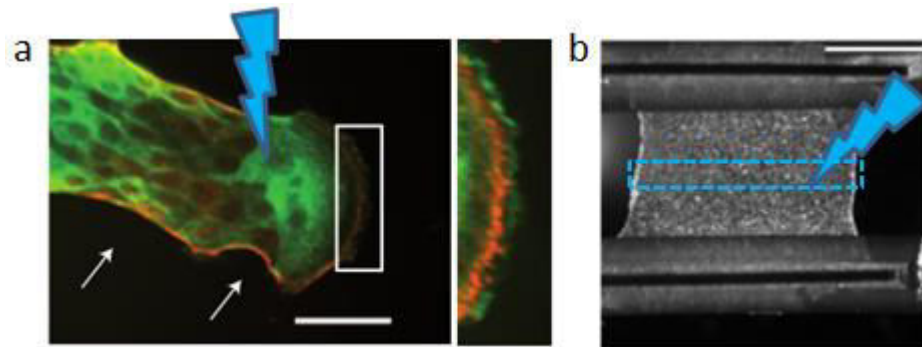


Figure 5-6 : (a) Comportement de cellules NIH/3T3 lors d'une expérience de wound healing. Sur cette image est présenté la formation d'un « doigt » de cellule avec à l'avant de celui-ci la présence d'une cellule leader. En rouge est représenté le signal myosine et en vert le signal actine. Les flèches représentent les câbles d'acto-myosines partagés entre plusieurs cellules. Barre d'échelle : 50 μm . Image adaptée de (8). (b) Image d'un film de cellules suspendu entre deux barreaux permettant d'exercer/de mesurer des forces. Barre d'échelle : 1 mm. Image adaptée de (128).

5.3.4 In vivo

Tel quel, ce système pourrait être utilisé *in vivo*, en particulier au stade de la cellule unique chez l'embryon (Figure 5-7). Cela pourrait permettre de tester différentes théories comme, par exemple, qu'une activation de RhoA au milieu de la cellule permet, à elle seule, d'entraîner sa séparation en deux (130)(131) et mimer ainsi la mécanique de la division cellulaire (34).

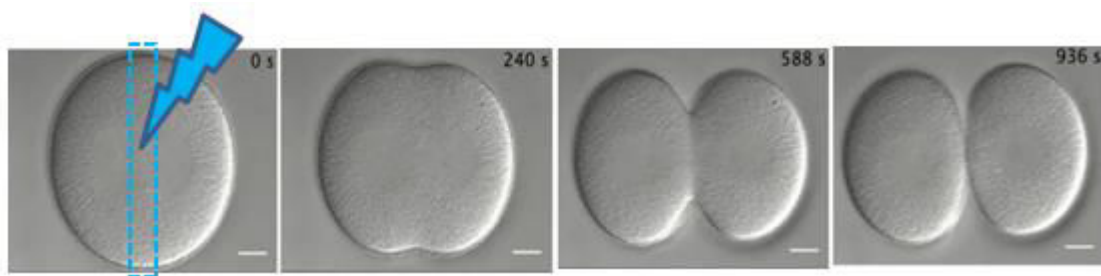


Figure 5-7 : Image adaptée de (130) présentant les différents stades de la première division de l'embryon de l'oursin dollar *Dendroaster*. Barre d'échelle : 20 μm .

Nous venons d'énumérer brièvement quelques projets dans lesquels l'approche utilisée durant cette thèse – le contrôle quantitatif d'une perturbation couplé à l'analyse précise de la réponse – pourrait être appliquée immédiatement. Il en existe bien sûr de nombreux autres. Par ailleurs, avec quelques modifications au niveau des protéines CRY2/CIBN et/ou au niveau des domaines DHPH, il est possible d'augmenter immédiatement le champ d'activité de cet outil.

Bibliographie

1. Li R, Bowerman B. Symmetry breaking in biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2010 Nov 23];2(3):a003475. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2829966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Kim Y, Coppey M, Grossman R, Ajuria L, Jiménez G, Paroush Z, et al. MAPK Substrate Competition Integrates Patterning Signals in the *Drosophila* Embryo. *Curr Biol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2014 Jun 3];20(5):446–51. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210000588>
3. Kinkhabwala A, Bastiaens PIH. Spatial aspects of intracellular information processing. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2010 Feb [cited 2014 May 13];20(1):31–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096560>
4. Rauzi M, Verant P, Lecuit T, Lenne P-F. Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 Dec [cited 2014 May 8];10(12):1401–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978783>
5. Ganguly S, Williams LS, Palacios IM, Goldstein RE. Cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes varies with kinesin activity and correlates with the microtubule cytoskeleton architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Sep 4 [cited 2012 Sep 6]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949706>
6. Stern CD, Goodwin BC. Waves and periodic events during primitive streak formation in the chick. *J Embryol Exp Morphol* [Internet]. 1977 Oct;41(1955):15–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/591867>
7. Heisenberg C, Bellai Y. Review Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning. 2013;
8. Reffay M, Parrini MC, Cochet-Escartin O, Ladoux B, Buguin a, Coscoy S, et al. Interplay of RhoA and mechanical forces in collective cell migration driven by leader cells. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Apr 29];16(3):217–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561621>
9. Cheung KJ, Gabrielson E, Werb Z, Ewald AJ. Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Dec 19 [cited 2014 Apr 30];155(7):1639–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332913>
10. Liu JS, Farlow JT, Paulson AK, Labarge M a, Gartner ZJ. Programmed cell-to-cell variability in Ras activity triggers emergent behaviors during mammary epithelial morphogenesis. *Cell Rep* [Internet]. The Authors; 2012 Nov 29 [cited 2014 May 26];2(5):1461–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3634587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Barnhart EL, Lee K-C, Keren K, Mogilner A, Theriot J a. An adhesion-dependent switch between mechanisms that determine motile cell shape. *PLoS Biol* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Nov 7];9(5):e1001059. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Etienne-Manneville S. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* [Internet]. 2008 Nov 24 [cited 2014 May 6];27(55):6970–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029938>
13. Verkhovsky a B, Svitkina TM, Borisy GG. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol* [Internet]. 1999 Jan 14;9(1):11–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9889119>

14. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 May 27];21:247–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212495>
15. Anderson TW, Vaughan AN, Cramer LP. Retrograde Flow and Myosin II Activity within the Leading Cell Edge Deliver F-Actin to the Lamella to Seed the Formation of Graded Polarity Actomyosin II Filament Bundles in Migrating Fibroblasts. 2008;19(November):5006–18.
16. Moeendarbary E, Valon L, Fritzsche M, Harris AR, Moulding D a, Thrasher AJ, et al. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nat Mater* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Mar [cited 2013 Mar 3];12(3):253–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291707>
17. Charras GT, Mitchison TJ, Mahadevan L. Animal cell hydraulics. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Sep [cited 2010 Jul 30];122(Pt 18):3233–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2736862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Cai Y, Sheetz MP. Force propagation across cells: mechanical coherence of dynamic cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2011 Jun 17];21(1):47–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208463>
19. Koestler S a, Auinger S, Vinzenz M, Rottner K, Small JV. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2011 Sep 8];10(3):306–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18278037>
20. Pollard TD, Cooper J a. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* [Internet]. 2009 Nov 27 [cited 2010 Jul 14];326(5957):1208–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965462>
21. Kolega J. The Role of Myosin II Motor Activity in Distributing Myosin Asymmetrically and Coupling Protrusive Activity to Cell Translocation. *Mol Biol Cell*. 2006;17(October):4435– 4445.
22. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Nov;10(11):778–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851336>
23. Clainche CLE, Carlier M. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol Rev*. 2008;489 –513.
24. Ponti a, Machacek M, Gupton SL, Waterman-Storer CM, Danuser G. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* [Internet]. 2004 Sep [cited 2011 Jan 25];305(5691):1782–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375270>
25. Nemethova M, Auinger S, Small JV. Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J Cell Biol* [Internet]. 2008 Mar 24 [cited 2013 Nov 24];180(6):1233–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2290848&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
26. Schmoranz J, Kreitzer G, Simon SM. Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Nov [cited 2011 Feb 28];116(Pt 22):4513–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576345>
27. Gomes ER, Jani S, Gundersen GG. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* [Internet]. 2005 May 6 [cited 2012 Oct 26];121(3):451–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882626>
28. Kress H, Park J, Mejean CO, Forster JD, Park J, S S, et al. Cell stimulation with optically manipulated microsources Holger. 2010;6(12):1–13.
29. Ridley a J. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* [Internet]. 2001 Aug;114(Pt 15):2713–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683406>
30. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* [Internet]. 2002 Dec 12;420(6916):629–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460342>

31. Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Jul 22 [cited 2011 Jul 22];12(8):493–504. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3153>
32. Hoffman GR, Cerione R a. Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett* [Internet]. 2002 Feb 20;513(1):85–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911885>
33. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Feb [cited 2010 Jul 28];6(2):167–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688002>
34. Matthews HK, Delabre U, Rohn JL, Guck J, Kunda P, Baum B. Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression. *Dev Cell* [Internet]. 2012 Aug 14 [cited 2014 Jun 4];23(2):371–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3763371&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Alto NM. induced GTPase polarity circuit. 2013;148(4):803–15.
36. Burridge K, Wennerberg K, Hill C, Carolina N. Rho and Rac Take Center Stage Review. 2004;116:167–79.
37. Lin R, Cerione R a, Manor D. Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Aug 13 [cited 2013 Aug 1];274(33):23633–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438546>
38. Hall a. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* (80-) [Internet]. 1998 Jan 23 [cited 2014 May 4];279(5350):509–14. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.279.5350.509>
39. Etienne-Manneville S. Cdc42—the centre of polarity. *J Cell Sci* [Internet]. 2004 Mar [cited 2010 Aug 24];117(Pt 8):1291–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020669>
40. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* [Internet]. 2004 Jan;265(1):23–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001216060300544X>
41. Li R, Gundersen GG. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Nov;9(11):860–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946475>
42. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* (Hoboken) [Internet]. 2010 Sep [cited 2013 Nov 6];67(9):545–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3038199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. Chesarone M a, DuPage AG, Goode BL. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Jan [cited 2010 Jul 15];11(1):62–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997130>
44. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Jan 23];28(1-2):65–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19160018>
45. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2011 Jun 12];9(9):690–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719708>
46. Iden S, Collard JG. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2010 Jul 19];9(11):846–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946474>
47. Jilkine A, Marée AFM, Edelstein-Keshet L. Mathematical model for spatial segregation of the Rho-family GTPases based on inhibitory crosstalk. *Bull Math Biol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2013 Nov 22];69(6):1943–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457653>
48. Pertz O. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci* [Internet]. 2010 Jun;123(Pt 11):1841–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484664>

49. Aoki K, Matsuda M. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nat Protoc* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Jan [cited 2010 Aug 25];4(11):1623–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834477>
50. Meng F, Sachs F. Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched FRET sensor. *J Cell Sci* [Internet]. 2011 Jan 15 [cited 2014 Jun 17];124(Pt 2):261–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010192&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
51. Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Sep;461(7260):99–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693013>
52. Lessey EC, Guilluy C, Burridge K. From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry* [Internet]. 2012 Sep 25;51(38):7420–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22931484>
53. Théry M, Bornens M. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2011 Aug 3];18(6):648–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046223>
54. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz M a. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Sep [cited 2012 Jul 13];11(9):633–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2992881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Théry M, Racine V, Piel M, Pépin A, Dimitrov A, Chen Y, et al. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Dec 26;103(52):19771–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1750916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
56. Dupin I, Sakamoto Y, Etienne-Manneville S. Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *J Cell Sci* [Internet]. 2011 Mar 15 [cited 2013 Apr 18];124(Pt 6):865–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21378307>
57. Dupin I, Etienne-Manneville S. Nuclear positioning: mechanisms and functions. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [cited 2013 Mar 6];43(12):1698–707. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959251>
58. Van Dongen SFM, Maiuri P, Marie E, Tribet C, Piel M. Triggering cell adhesion, migration or shape change with a dynamic surface coating. *Adv Mater* [Internet]. 2013 Mar 25 [cited 2014 Apr 30];25(12):1687–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23355329>
59. Wilson K, Lewalle A, Fritzsche M, Thorogate R, Duke T, Charras G. Mechanisms of leading edge protrusion in interstitial migration. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Jan [cited 2014 May 5];4(May):2896. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3863902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Lin B, Holmes WR, Wang CJ, Ueno T, Harwell A, Edelstein-keshet L, et al. Synthetic spatially graded Rac activation drives cell polarization and movement. 2012;109(52).
61. Inoue T, Heo W Do, Grimley JS, Wandless TJ, Meyer T. An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nat Methods*. 2005;2(6):415–8.
62. Pastrana E. Optogenetics: controlling cell function with light. *Nat Methods* [Internet]. 2010 Dec 20 [cited 2011 Jul 18];8(1):24–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.f.323>
63. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* [Internet]. 2005 Sep [cited 2014 Apr 29];8(9):1263–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116447>
64. Deisseroth K. Optogenetics. 2011;8(1):26–9.
65. Williams SCP, Deisseroth K. Optogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Oct 8 [cited 2014 May 3];110(41):16287. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3799345&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Toettcher JE, Voigt CA, Weiner OD, Lim WA. The promise of optogenetics in cell biology : interrogating molecular circuits in space and time. *Commentary*. 2011;8(1):35–8.

67. Karunarathne WKA, Giri L, Kalyanaraman V, Gautam N. Optically triggering spatiotemporally confined GPCR activity in a cell and programming neurite initiation and extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Mar 11 [cited 2013 Mar 14];1565–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479634>
68. Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, et al. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* [Internet]. 2009 Sep 3 [cited 2011 Jul 22];461(7260):104–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2766670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Levskaya A, Weiner OD, Lim W a, Voigt C a. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Oct 15 [cited 2010 Jul 19];461(7266):997–1001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749742>
70. Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, Schwartz JW, Ehlers MD, Tucker CL. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Oct [cited 2010 Nov 3];7(OctObseR):10–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037589>
71. Strickland D, Lin Y, Wagner E, Hope CM, Zayner J, Antoniou C, et al. tulipS : tunable , light-controlled interacting protein tags for cell biology. 2012;9(4).
72. Zhou XX, Chung HK, Lam a. J, Lin MZ. Optical Control of Protein Activity by Fluorescent Protein Domains. *Science* (80-) [Internet]. 2012 Nov 8 [cited 2012 Nov 9];338(6108):810–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1226854>
73. Demarco RS, Struckhoff EC, Lundquist E a. The Rac GTP exchange factor TIAM-1 acts with CDC-42 and the guidance receptor UNC-40/DCC in neuronal protrusion and axon guidance. *PLoS Genet* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Jul 29];8(4):e1002665. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3343084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
74. Friesland A, Zhao Y, Chen Y-H, Wang L, Zhou H, Lu Q. Small molecule targeting Cdc42-intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Jan 22 [cited 2013 Feb 27];110(4):1261–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284167>
75. Toettcher JE, Gong D, Lim W a, Weiner OD. Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics. *Nat Methods* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Sep 11 [cited 2011 Sep 13];(septembeR). Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.1700>
76. Idevall-hagren O, Dickson EJ, Hille B, Toomre DK, Camilli P De. Optogenetic control of phosphoinositide metabolism. 2012;109(35).
77. Hughes RM, Bolger S, Tapadia H, Tucker CL. Light-mediated control of DNA transcription in yeast. *Methods* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Aug 15 [cited 2012 Aug 29];4–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922268>
78. Lee S, Park H, Kyung T, Kim NY, Kim S, Kim J, et al. Reversible protein inactivation by optogenetic trapping in cells. *Nat Methods* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 May 4 [cited 2014 May 4];(May):1–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.2940>
79. Semiquinone F, Banerjee R, Schleicher E, Meier S, Mun R, Pokorny R, et al. The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 May 18 [cited 2011 Jan 20];282(20):14916–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17355959>
80. Bugaj LJ, Choksi AT, Mesuda CK, Kane RS, Schaffer D V. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells. *Nat Methods* [Internet]. 2013 Mar [cited 2013 Feb 28];10(3):249–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377377>
81. Sprague BL, McNally JG. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2011 Jul 29];15(2):84–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695095>
82. Analysis T, Fluorescence OF, Experiments PR. BRIEF COMMUNICATION THEORETICAL ANALYSIS OF FLUORESCENCE PHOTOBLEACHING RECOVERY EXPERIMENTS. 1983;(January):95–7.
83. 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 Nanotechnol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Mar 3 [cited 2013 Mar 5];8(3):193–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nnano.2013.23>

84. Dubash AD, Wennerberg K, García-Mata R, Menold MM, Arthur WT, Burridge K. A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Nov 15 [cited 2013 Aug 1];120(Pt 22):3989–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971419>
85. Miller NLG, Lawson C, Chen XL, Lim S-T, Schlaepfer DD. Rgnef (p190RhoGEF) knockout inhibits RhoA activity, focal adhesion establishment, and cell motility downstream of integrins. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Jul 29];7(5):e37830. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3359313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. Jaiswal M, Gremer L, Dvorsky R, Haeusler LC, Cirstea IC, Uhlenbrock K, et al. Mechanistic insights into specificity, activity, and regulatory elements of the regulator of G-protein signaling (RGS)-containing Rho-specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and leukemia-associated RhoGEF (LARG). *J Biol Chem* [Internet]. 2011 May 20 [cited 2013 Aug 1];286(20):18202–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3093892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Filonov GS, Piatkevich KD, Ting L-M, Zhang J, Kim K, Verkhusa V V. Bright and stable near-infrared fluorescent protein. *Nat Biotechnol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Aug [cited 2012 Jul 14];29(8):757–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3152693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* [Internet]. 2006 Apr 20 [cited 2013 Aug 8];440(7087):1069–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547516>
89. Taunton J, Rowning BA, Coughlin ML, Wu M, Moon RT, Mitchison TJ, et al. Actin-dependent Propulsion of Endosomes and Lysosomes by Recruitment of N-WASP. *Science*. 2000;288(5417):102–10.
90. Bogdan S, Schultz J, Grosshans J, Neurobiologie I, Münster U, Würzburg U, et al. Physiological roles of Diaphanous (Dia) in actin dynamics Formin' cellular structures. 2013;1–12.
91. Gauthier NC, Fardin MA, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Aug 30 [cited 2014 May 30];108(35):14467–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3167546&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
92. Kim D-H, Cho S, Wirtz D. Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *J Cell Sci* [Internet]. 2014 Mar 17 [cited 2014 May 30];2528–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639463>
93. Sordella R, Van Aelst L. Dialogue between RhoA/ROCK and members of the Par complex in cell polarity. *Dev Cell* [Internet]. 2008 Feb [cited 2013 Nov 26];14(2):150–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18267081>
94. Houk AR, Jilkine A, Mejean CO, Boltysanskiy R, Dufresne ER, Angenent SB, et al. Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012 Jan 20 [cited 2013 Mar 1];148(1-2):175–88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3308728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
95. Diz-Muñoz A, Fletcher D a, Weiner OD. Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Mar 1];23(2):47–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23122885>
96. Sedzinski J, Biro M, Oswald A, Tinevez J-Y, Salbreux G, Paluch E. Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 25 [cited 2014 May 5];476(7361):462–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822289>
97. Berginski ME, Vitriol E a, Hahn KM, Gomez SM. High-resolution quantification of focal adhesion spatiotemporal dynamics in living cells. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Mar 11];6(7):e22025. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
98. Rao MV, Chu P-H, Hahn KM, Zaidel-Bar R. An optogenetic tool for the activation of endogenous diaphanous-related formins induces thickening of stress fibers without an increase in contractility. *Cytoskeleton (Hoboken)* [Internet]. 2013 Jul [cited 2013 Aug 8];70(7):394–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677607>
99. Ciobanaru C, Faivre B, Le Clainche C. Actin dynamics associated with focal adhesions. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Nov 27];2012:941292. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3312244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

-
100. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bradke F, et al. Lifeact : a versatile marker to visualize F-actin. 2008;5(7):605–7.
101. Fritzsche M, Lewalle A, Duke T, Kruse K, Charras G. Analysis of turnover dynamics of the submembranous actin cortex. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 May 5];24(6):757–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3596247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
102. Yang C, Czech L, Gerboth S, Kojima S, Scita G, Svitkina T. Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol* [Internet]. 2007 Nov;5(11):e317. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044991>
103. Gregor T, Tank DW, Wieschaus EF, Bialek W. Probing the limits to positional information. *Cell* [Internet]. 2007 Jul 13 [cited 2014 May 28];130(1):153–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2253670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
104. Yam PT, Wilson C a, Ji L, Hebert B, Barnhart EL, Dye N a, et al. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol* [Internet]. 2007 Sep 24 [cited 2010 Jul 28];178(7):1207–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2064654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
105. Watanabe N, Kato T, Fujita a, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* [Internet]. 1999 Jul;1(3):136–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559899>
106. Peng GE, Wilson SR, Weiner OD. A pharmacological cocktail for arresting actin dynamics in living cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2011 Nov [cited 2014 May 6];22(21):3986–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
107. Tseng P, Judy JW, Di Carlo D. Magnetic nanoparticle-mediated massively parallel mechanical modulation of single-cell behavior. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Oct 14 [cited 2012 Oct 31];9(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064517>
108. Ridley AJ, Schwartz M a, Burridge K, Firtel R a, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* [Internet]. 2003 Dec 5 [cited 2011 Jul 12];302(5651):1704–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657486>
109. Cramer LP. Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Jul [cited 2013 Dec 12];12(7):628–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596043>
110. Cramer LP. Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Oct [cited 2013 Dec 12];25(5):591–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764164>
111. Zilberman Y, Alieva NO, Miserey-Lenkei S, Lichtenstein A, Kam Z, Sabanay H, et al. Involvement of the Rho-mDia1 pathway in the regulation of Golgi complex architecture and dynamics. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2011 Aug 15 [cited 2013 Nov 9];22(16):2900–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3154885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
112. Palazzo a F, Cook T a, Alberts a S, Gundersen GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2001 Aug;3(8):723–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483957>
113. Versaevol M, Grevesse T, Gabriele S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Jan [cited 2013 Jun 1];3:671. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22334074>
114. Hirota T, Lee JW, St John PC, Sawa M, Iwaisako K, Noguchi T, et al. Identification of Small Molecule Activators of Cryptochrome. *Science* [Internet]. 2012 Jul 12 [cited 2012 Jul 20];1094. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22798407>
115. Martial FP, Hartell N a. Programmable illumination and high-speed, multi-wavelength, confocal microscopy using a digital micromirror. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 May 25];7(8):e43942. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3427176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
116. Specht CG, Izeddin I, Rodriguez PC, El Beheiry M, Rostaing P, Darzacq X, et al. Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 Jul 24 [cited 2014 May 29];79(2):308–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889935>

117. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration Ryan. *Mol Cell*. 2010;10(8):538–49.
118. Bernheim-Groswasser A, Wiesner S, Golsteyn RM, Carlier M-F, Sykes C. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* [Internet]. 2002 May 16;417(6886):308–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015607>
119. Trichet L, Campàs O, Sykes C, Plastino J. VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys J* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2014 Jun 30];92(3):1081–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1779978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
120. Bornschlöggl T, Romero S, Vestergaard CL, Joanny J. Filopodial retraction force is generated by cortical actin dynamics and controlled by reversible tethering at the tip. 2013;
121. Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J* [Internet]. 2001 Apr;80(4):1744–57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1301364&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
122. Charras G, Paluch E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Sep;9(9):730–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628785>
123. Bovellan M, Fritzsche M, Stevens C, Charras G. Death-associated protein kinase (DA PK) and signal transduction: blebbing in programmed cell death. *FEBS J* [Internet]. 2010 Jan;277(1):58–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878312>
124. Paluch EK, Raz E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Oct [cited 2014 May 2];25(5):582–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3989058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
125. Baumann K. Switching to 3D. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;13(6):338–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3365>
126. Friedl P, Sahai E, Weiss S, Yamada KM. New dimensions in cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Nov [cited 2013 Mar 12];13(11):743–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23072889>
127. Petrie RJ, Gavara N, Chadwick RS, Yamada KM. Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Apr 30 [cited 2012 Apr 30];197(3):439–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3341168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
128. Harris AR, Peter L, Bellis J, Baum B, Kabla AJ, Charras GT. Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Oct 9 [cited 2012 Oct 28];109(41):16449–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22991459>
129. Kruse K, Riveline D. Spontaneous mechanical oscillations: implications for developing organisms. [Internet]. 1st ed. Current topics in developmental biology. Elsevier Inc.; 2011 [cited 2014 Apr 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21501749>
130. Turlier H, Audoly B, Prost J, Joanny J-F. Furrow constriction in animal cell cytokinesis. *Biophys J* [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2014 May 31];106(1):114–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411243>
131. Fededa JP, Gerlich DW. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 May 2 [cited 2012 May 2];14(5):440–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb2482>