



HAL
open science

Mesures mécaniques et génération de forces de réseaux d'actine branchés avec des micro-cylindres magnétiques

Pierre Bauër

► **To cite this version:**

Pierre Bauër. Mesures mécaniques et génération de forces de réseaux d'actine branchés avec des micro-cylindres magnétiques. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066428 . tel-01593237

HAL Id: tel-01593237

<https://theses.hal.science/tel-01593237>

Submitted on 26 Sep 2017

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.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physique

École doctorale : « Physique en Île de France »

réalisée

au Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes

présentée par

Pierre BAUËR

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Mesures mécaniques et génération de forces de réseaux d'actine
branchés avec des micro-cylindres magnétiques

soutenue le 24 Septembre 2015

devant le jury composé de :

M ^{me}	Rajaa BOUJEMAA-PATERSKI	Rapporteur
M ^{me}	Nora DEMPSEY	Rapporteur
M.	Claude VERDIER	Examineur
M.	Raphaël VOITURIEZ	Examineur
M.	Julien HEUVINGH	Directeur de thèse
M ^{me}	Olivia du ROURE	Directrice de thèse
M.	Enrique De La CRUZ	Membre Invité

Table des matières

Introduction	7
1 Le cytosquelette	9
1.1 Importance de la mécanique cellulaire	10
1.1.1 La migration cellulaire	10
1.1.2 Déformabilité	12
1.1.3 Mécanosensation	12
1.2 Les polymères du cytosquelette	13
1.2.1 Les microtubules	14
1.2.2 Les microfilaments d'actine	15
1.2.3 Les filaments intermédiaires	15
1.3 Les filaments d'actine	16
1.3.1 La protéine	16
1.3.2 Dynamique de polymérisation	17
1.3.3 Les partenaires de l'actine	18
1.4 Le cytosquelette d'actine	22
1.4.1 Cortex	23
1.4.2 Les fibres de stress	23
1.4.3 Le lamellipode	23
1.4.4 Les filopodes	24
1.5 Reconstitution de gels d'actine branchés <i>in vitro</i>	25
2 Mesures mécaniques en biologie et applications à l'étude du cytosquelette	29
2.1 Mesures mécaniques et de forces en biologie	29
2.1.1 Différentes méthodes de mesures	30
2.1.2 Méthodes magnétiques	32
2.2 Mécanique des réseaux d'actine	38
2.2.1 Polymères et définitions de quelques grandeurs	39
2.2.2 Travaux théoriques sur les réseaux de polymères semi-flexibles	40
2.2.3 Travaux expérimentaux de rhéologie des réseaux d'actine assemblés en solution	41
2.2.4 Travaux expérimentaux sur des gels d'actine branchés <i>in vitro</i>	43
2.3 Génération de forces	48

2.3.1	Modèle du Brownian ratchet	49
2.3.2	Brownian ratchet élastique	50
2.3.3	Passage à N filaments	50
2.3.4	Modèle auto catalytique - Simulations numériques	52
2.3.5	Travaux préalables	52
3	Aspects expérimentaux	59
3.1	Vers une nouvelle méthode de mesure	59
3.2	Comment fabriquer des microparticules magnétiques de géométrie contrôlée?	61
3.2.1	Méthodes de fabrication existantes	61
3.2.2	Limitations	61
3.3	Cylindres	62
3.3.1	Microfabrication des cylindres superparamagnétiques	62
3.3.2	Mesure de la susceptibilité magnétique des cylindres	68
3.3.3	Calcul de la force d'interaction entre deux cylindres	71
3.4	Reconstitution de gels d'actine <i>in vitro</i> à la surface de colloïdes superparamagnétiques	76
3.4.1	Méthodes de fonctionnalisation des cylindres	76
3.4.2	Mélange de croissance	77
3.4.3	Préparation de l'échantillon	77
3.5	Montage expérimental	78
3.6	Traitement d'images	80
3.6.1	Corrélation subpixels d'images	80
3.6.2	Détermination des contours des cylindres	83
4	Résultats	89
4.1	Auto-organisation des cylindres et croissance des gels	90
4.1.1	Alignement des cylindres	90
4.1.2	Aspect des gels	90
4.1.3	Évolution de la densité des gels en fonction de la concentration en Arp2/3	91
4.2	Premières mesures	93
4.2.1	Rampes de forces et mesures de mécanique non-linéaire	93
4.2.2	Croissance à champ magnétique constant	93
4.3	Mesure intégrée de la vitesse de croissance et de la mécanique	95
4.3.1	Champ magnétique exercé	96
4.3.2	Suivi de l'épaisseur d'un gel au cours du temps	97
4.4	Mécanique des réseaux d'actine	98
4.4.1	Extraction des données de mécanique	98
4.4.2	Caractérisation du module élastique des gels pour une concentration en Arp2/3 fixée à 100 nM	99
4.4.3	Évolution du module d'Young en fonction de la concentration en Arp2/3	102
4.5	Croissance de gels sous contrainte	103

4.5.1	Extraction des données de vitesse	103
4.5.2	Caractérisation à $[\text{Arp2/3}]=100$ nM	104
4.5.3	Caractérisation à $[\text{Arp2/3}]<30$ nM	104
4.6	Effet des itérations sur les propriétés des gels	105
4.6.1	Itérations à l'échelle d'un gel	106
4.6.2	Évolution des gels en fonction des itérations successives pour différentes concentrations en Arp2/3	107
4.7	Relation entre mécanique et vitesse	110
4.8	Ce qu'il reste à faire	112
Annexes		128
A Concentration des tampons		129
B Caractérisation des billes superparamagnétiques Ademtech		131
C Estimation de la courbure de la surface des cylindres et conséquences sur la force magnétique		133
D Evolution du module élastique en fonction de la contrainte pour différentes concentrations en Arp2/3		135
E Étude mécanique des cellules		137
E.1	Contexte	137
E.2	Détermination des propriétés mécaniques des cellules	137
F Publication		141

Introduction

Cette thèse est consacrée à l'étude des propriétés mécaniques et de génération de forces du cytosquelette d'actine, et plus précisément aux réseaux d'actine branchés que l'on retrouve au sein du lamellipode. Cette étude a été conduite par une nouvelle méthode de mesures que nous décrirons.

Le chapitre 1 sera consacré à une introduction à la mécanique cellulaire, notamment au rôle joué par le cytosquelette dans la mécanique et dans les processus de migration.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux méthodes de mesures de forces utilisées en biologie, avec un accent sur les méthodes magnétiques. Nous verrons aussi quelques modèles développés pour décrire la génération de forces observée dans les réseaux d'actine branchés du lamellipode, ainsi que les expériences mises en oeuvre à ce jour qui ont permis de faire des mesures concernant la mécanique et la génération de forces de ces réseaux.

Dans le chapitre 3, nous développons une nouvelle méthode permettant de mesurer la mécanique et la génération de forces des réseaux d'actine branchés, basée sur l'interaction entre des cylindres superparamagnétiques soumis à un champ magnétique. Nous décrirons des méthodes de fabrication de colloïdes de forme anisotrope développées dans la littérature, ainsi que celle développée dans notre équipe au laboratoire PMMH. Le dispositif expérimental et les méthodes d'analyse d'images permettant d'obtenir les données recherchées seront aussi décrites.

Le chapitre 4 sera consacré aux résultats obtenus pendant cette thèse. Nous décrirons les résultats concernant la mécanique des gels d'actine branchés, et ceux concernant la génération de forces.

Chapitre 1

Le cytosquelette

Sommaire

1.1	Importance de la mécanique cellulaire	10
1.1.1	La migration cellulaire	10
1.1.2	Déformabilité	12
1.1.3	Mécanosensation	12
1.2	Les polymères du cytosquelette	13
1.2.1	Les microtubules	14
1.2.2	Les microfilaments d'actine	15
1.2.3	Les filaments intermédiaires	15
1.3	Les filaments d'actine	16
1.3.1	La protéine	16
1.3.2	Dynamique de polymérisation	17
1.3.3	Les partenaires de l'actine	18
1.4	Le cytosquelette d'actine	22
1.4.1	Cortex	23
1.4.2	Les fibres de stress	23
1.4.3	Le lamellipode	23
1.4.4	Les filopodes	24
1.5	Reconstitution de gels d'actine branchés <i>in vitro</i>	25

La cellule est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice du vivant. Elle a généralement une taille de l'ordre de la dizaine de micromètres, et son module élastique varie de 0.2 kPa à quelques dizaines de kPa ([Sokolov, 2007]). C'est un objet très dynamique, et ses propriétés mécaniques jouent un rôle central dans de nombreux processus biologiques tels que l'embryogenèse, la contraction cellulaire, l'étalement ou la migration. La cellule agit sur son environnement, et de même, l'environnement mécanique agit sur la régulation de l'expression de certaines de ses protéines et sur leurs interactions, modifiant ainsi ses propriétés. Ce sera l'objet de la section 1.1.

La mécanique d'une cellule est principalement régie par son cytosquelette, un ensemble organisé des polymères biologiques à travers le cytoplasme. Il sera amplement décrit dans ce chapitre (section 1.2), avec un accent mis sur l'actine, sujet de notre étude (section 1.3), et ses différentes

structures (section 1.4). La reconstitution de réseaux d'actine branchés permettant leur étude *in vitro* fera l'objet de la section 1.5.

1.1 Importance de la mécanique cellulaire

La mécanique intervient dans la vie des cellules à différents niveaux pour contrôler leur rigidité, pour la génération de forces intervenant dans les processus de migration, lors de la mécanotransduction, ou d'autres. Par exemple, les cellules exercent des forces de l'ordre de quelques nanonewtons sur leur environnement ([Choquet et al., 1997]) comme des forces de traction sur leur substrat ([du Roure et al., 2005]), mais elles subissent aussi des forces comme la pression exercée par les tissus alentours ou les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin. Nous décrivons ici certaines de ces fonctions mécaniques.

1.1.1 La migration cellulaire

La migration cellulaire est une propriété majeure des cellules qui intervient lors de nombreux processus physiologiques tels que :

- Le développement embryonnaire, où les cellules migrent en des endroits spécifiques pour la morphogénèse des tissus et des organes
- La cicatrisation, où les cellules migrent pour restaurer un tissu endommagé
- La vascularisation, où les cellules endothéliales (qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins) migrent pour former un réseau de capillaires lors de l'angiogénèse (i.e la création de nouveaux vaisseaux)

Ces mécanismes peuvent aussi intervenir dans des processus pathologiques tels que :

- L'inflammation, où les leucocytes (globules blancs) migrent vers les sites infectés pour détruire les bactéries
- La métastatisation des cancers, où les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire pour se disséminer à travers l'organisme via le réseau sanguin
- La croissance tumorale, résultant en particulier de dérèglements de la prolifération cellulaire et du comportement migratoire des cellules
- La vascularisation tumorale, où les cellules endothéliales migrent en réponse à des facteurs de croissance sécrétés par la tumeur

La migration cellulaire est souvent guidée par différents facteurs physiques et/ou chimiques du microenvironnement. On peut par exemple citer :

- La chimiotaxie, induite par un gradient de facteur chimioattractant (facteur de croissance, etc...)
- L'haptotaxie, induite par un gradient de protéines d'adhésion fixées dans la matrice extracellulaire
- La durotaxie, induite par un gradient de rigidité dans la matrice extracellulaire

- La mécanotaxie, induite par des forces de tension mécanique orientées, perçues via la matrice extracellulaire

L'actine du cytosquelette joue un rôle fondamental dans le processus de migration sur une surface, qui s'effectue en plusieurs étapes. La première consiste en l'extension du lamellipode (une large extension membranaire décrite en section 1.4.3). La seconde est l'adhésion du lamellipode au substrat, via des points d'adhésion focaux. Enfin, la cellule se contracte et détache ses points d'adhésion à l'arrière (figure 1.1).

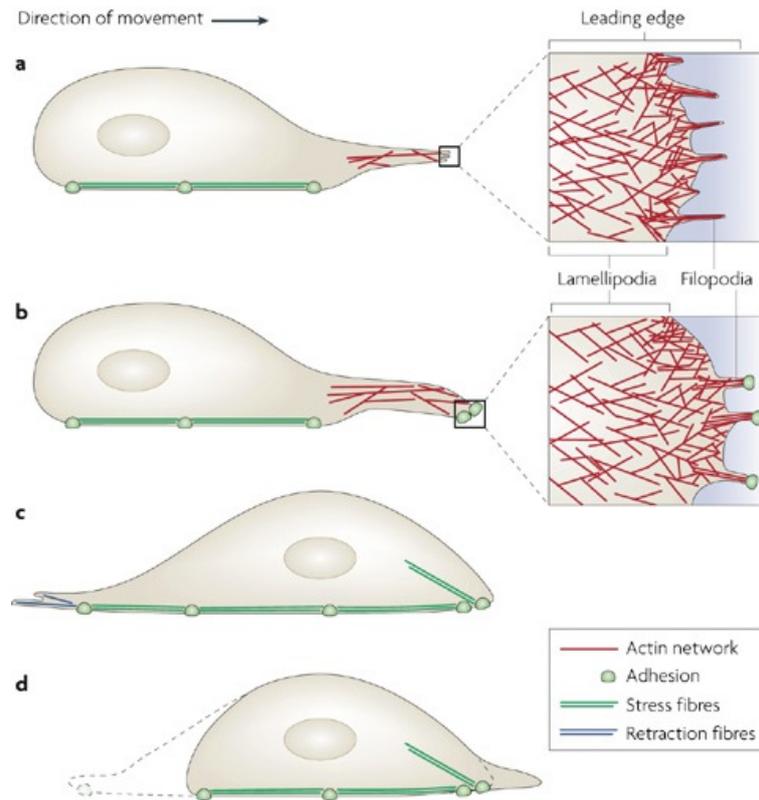


FIGURE 1.1 – Les étapes de la migration cellulaire : (A) Dans une cellule, la motilité est initiée par une protrusion à l'avant de la cellule, qui est composée de structures telles que les filipodes et le lamellipode. Ces protrusions contiennent des filaments d'actine poussant contre la membrane plasmique. Nous reviendrons sur ces notions dans les sections suivantes. (B) Durant l'extension des protrusions cellulaires, la membrane plasmique établit des points d'adhésion à la surface à l'avant de la cellule, appelés adhésions focales. (C) Ensuite, le noyau et le corps de la cellule sont poussés vers l'avant par des forces de contraction intracellulaires médiées par les fibres de stress. (D) Ensuite, les fibres de rétraction tirent l'arrière de la cellule vers l'avant. D'après [Mattila and Lappalainen, 2008a]

En 3D, la cellule utilise plutôt des mouvements amiboïdes ou des blebs pour migrer [Friedl and Bro, 2000]. Les blebs sont des protrusions sous forme de coque qui se produisent à la surface de la cellule. Ils apparaissent dans des études sur des systèmes unicellulaires ([Stockem et al., 1982, Pomorski et al., 2007]) et multicellulaires ([Sahai et al., 2007]), et généralement dans les

processus d'apoptose ou de nécrose ([Fackler and Grosse, 2008]).

Leur formation peut être décrite en trois étapes majeures : l'initiation, l'expansion, et la rétraction ([Charras and Paluch, 2008]). Ces mouvements sont générés par l'actine corticale, avec des interactions faibles et de courte durée avec le substrat ([Friedl and Wolf, 2003, Pinner and Sahai, 2008]). Certains cancers utilisent préférentiellement ce type de motilité pour éviter les interactions avec la matrice extra-cellulaire (ECM) [Sahai and Marshall, 2003] et échapper aux barrières des tissus [Friedl and Wolf, 2003].

De récentes études ont montré que le mouvement amiboïde permettait de migrer plus rapidement dans des milieux confinés, sans adhésions focales, et que son mécanisme était dû à un flux rétrograde de l'actine corticale de la cellule à travers des adhésions non spécifiques avec le substrat [Bergert et al., 2015, Berre et al., 2015, Maiuri et al., 2015].

1.1.2 Déformabilité

Les cellules sont amenées à se déformer dans de nombreuses situations au cours de leur existence, par exemple lors de la morphogénèse de l'embryon, lors de la division cellulaire [Heng and Koh, 2010], lors du passage au travers d'une constriction, lors de la respiration avec la déformation des cellules pulmonaires ([Yuan et al., 2000]), ou encore lors de l'étalement.

Les cellules cancéreuses doivent se déformer pour pouvoir passer à travers une constriction. [Byun et al., 2013] ont réalisé un montage expérimental permettant d'observer le passage d'une cellule à travers une constriction dans un canal microfluidique. Ils peuvent notamment mesurer la vitesse d'entrée de la cellule dans la constriction, ainsi que la vitesse de la cellule pendant qu'elle y transite. En perturbant le cytosquelette de la cellule en injectant une drogue (LatB) qui perturbe les filaments d'actine, ils peuvent augmenter la déformabilité de la cellule, ce qui augmente de trois à quatre fois la vitesse d'entrée dans le canal.

1.1.3 Mécanosensation

Le cytosquelette d'actine joue un rôle primordial dans le processus de mécanosensation, i.e la capacité d'une cellule à sentir et à répondre à des forces externes qui lui sont appliquées.

Les fondements physiologiques de l'ouïe et de l'équilibre sont la conversion d'un stimuli mécanique en un signal nerveux. Les forces mécaniques exercées par le milieu extérieur sur des mécanorécepteurs à la surface de la cellule ouvrent les canaux ioniques mécanosensitifs dans la membrane cellulaire pour produire des signaux électriques et mécaniques jusqu'au noyau, afin de signaler une sensation d'audition (voir figure 1.2). Les processus de sensation de ces forces à travers les canaux ioniques sont toujours en discussion [Brohawn et al., 2014].

Un autre exemple concerne la capacité qu'a une cellule à sentir la rigidité de son environnement et de réagir en conséquence. On peut par exemple citer les travaux de [Engler et al., 2006, Chowdhury et al., 2010, Ehrlicher et al., 2011, Luo et al., 2013]. [Engler et al., 2006] ont montré que des cellules souches se différencient en fonction de la rigidité de leur microenvironnement (voir figure 1.3). Ainsi, elles se différencient en neurones sur des substrats de rigidité faible, en cellules musculaires pour des rigidités intermédiaires, et en ostéoblastes quand la rigidité du

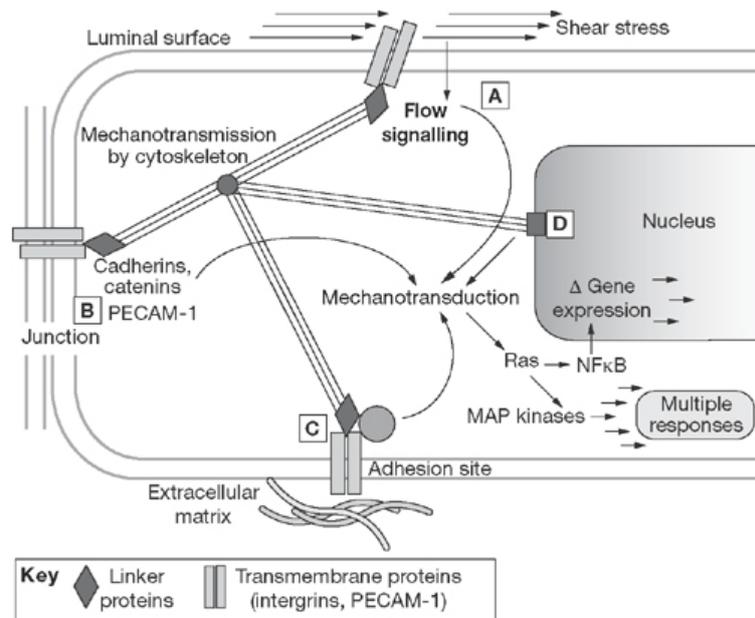


FIGURE 1.2 – Schéma de la mécanotransduction pour une cellule endothéliale soumise à un cisaillement par le flux sanguin. D'après [Davies, 2009].

substrat est forte. On voit en figure 1.3.B que la forme des cellules après différenciation est très différente d'un substrat à l'autre.

Conclusion : A travers ces quelques exemples, on voit que la cellule doit constamment adapter sa forme et sa rigidité pour interagir avec son environnement. Le cytosquelette joue un rôle majeur pour assurer aux cellules ces propriétés. La suite de ce premier chapitre lui est consacrée.

1.2 Les polymères du cytosquelette

Le cytosquelette est une assemblée de réseaux de différents biopolymères et de protéines régulatrices associées. Il a trois fonctions principales dans la cellule :

- Il organise spatialement le contenu de la cellule
- Il connecte de manière biochimique la cellule à son environnement externe
- Il génère des forces coordonnées qui permettent à la cellule de se déplacer, de changer de forme et de rigidité

Pour effectuer ces différentes fonctions, le cytosquelette intègre l'activité d'une multitude d'organelles et de protéines cytoplasmiques en flux constant [Fletcher and Mullins, 2010]. Il y a trois principaux types de polymères cytoplasmiques : les filaments d'actine, les microtubules et un groupe de polymères connus collectivement sous le nom de filaments intermédiaires (voir image 1.4) . Les trois sont organisés en réseaux qui résistent aux déformations et qui peuvent se réorganiser en réponse à des forces extérieures appliquées. La constante polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine et des microtubules génère des forces dirigées qui conduisent au changement de forme de la cellule, et de concert avec les moteurs moléculaires qui se déplacent

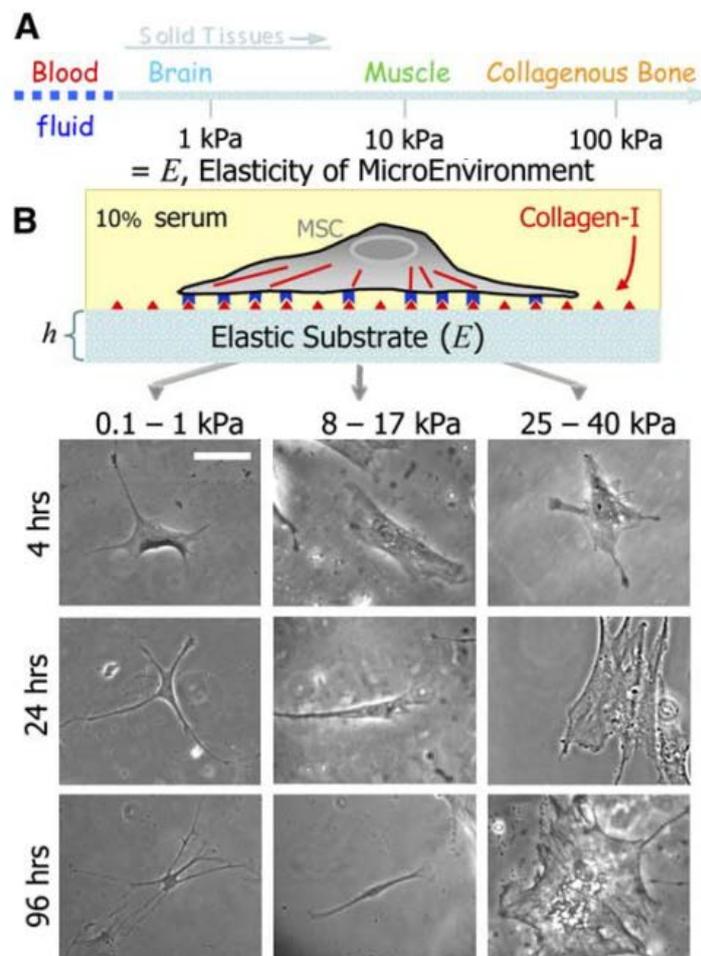


FIGURE 1.3 – Mécanosensation et différenciation. D'après [Engler et al., 2006].

le long de ces filaments ils guident l'organisation des compartiments cellulaires (ce dernier sujet ne sera pas abordé dans cette thèse). L'architecture des réseaux formant le cytosquelette est contrôlée par différentes classes de protéines régulatrices que nous verrons plus spécifiquement pour l'actine en section 1.3.3.

Les différences les plus importantes entre ces trois filaments du cytosquelette sont leur rigidité mécanique, leur dynamique d'assemblage, leur polarité, et le type de moteurs moléculaires avec lesquels ils s'assemblent. Nous allons maintenant les décrire plus en détails.

1.2.1 Les microtubules

Les microtubules sont les plus rigides des filaments du cytosquelette et ont une dynamique d'assemblage et de désassemblage très complexe. Ils ont un diamètre d'environ 20 nm et une longueur variable du fait de leur dynamique. Les microtubules sont formés de dimères de tubuline assemblés bout à bout en protofilaments, constituant ainsi la paroi des microtubules dont l'intérieur est vide. Ils sont rigides à l'échelle de la cellule : Leur longueur de persistance (qui caractérise leur rigidité) est de l'ordre de 5 mm (voir section 2.2.1 pour une définition plus précise de la longueur de persistance), ce qui est grand devant la taille d'une cellule (de l'ordre de 10-50

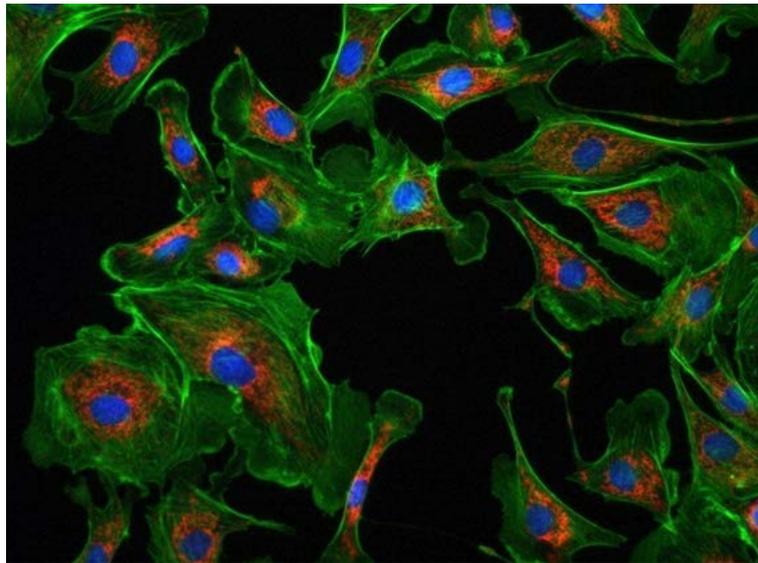


FIGURE 1.4 – Cellules. En vert : l'actine, en rouge : les microtubules, en bleu : le noyau.

μm).

Les microtubules sont impliqués dans la formation de la plaque équatoriale et le déplacement polaire des chromosomes pendant la mitose. Ils participent aussi au trafic cellulaire en permettant le mouvement des organites le long de leur axe via les moteurs moléculaires.

1.2.2 Les microfilaments d'actine

Les filaments d'actine sont beaucoup moins rigides que les microtubules, mais la présence d'une grande concentration de protéines partenaires se liant à eux génère l'assemblage de structures organisées et de réseaux d'architectures variées : réseaux réticulés, en fagots ou branchés (ce dernier point sera largement étudié dans la suite de cette thèse). Les filaments d'actine, tout comme les microtubules, sont polarisés et dynamiques, et des réseaux de filaments très branchés supportent le front avant de la plupart des cellules motiles, génèrent les forces impliquées dans le changement de forme de la cellule comme par exemple pendant la phagocytose, ou encore permettent d'exercer une traction sur la matrice extracellulaire via des fibres de tension ("stress fibers") dans les fibroblastes tissulaires, ce qui est essentiel pour entamer la cicatrisation.

1.2.3 Les filaments intermédiaires

Ce sont les moins rigides des filaments du cytosquelette, et ils résistent mieux à la tension qu'à la compression ([Fletcher and Mullins, 2010]). Ils peuvent être réticulés entre eux, ou même avec l'actine ou les microtubules via une protéine appelée plectine ([Wiche, 1998]). Contrairement à l'actine et aux microtubules, les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés et ne sont pas le support de moteurs moléculaires. Les principaux exemples de tels filaments sont les lamines, les kératines, ou les neurofilaments. Ils permettent notamment d'assurer l'intégrité de la cellule en lui assurant une stabilité mécanique. Les récents travaux de [Seltmann et al., 2013] montrent que des cellules sans kératine peuvent se déformer de 60% supplémentaires par rapport à des cellules saines. Cependant, peu d'études ont été menées jusqu'à présent, et la compréhension de leur rôle

dans les propriétés mécaniques en est seulement à ses débuts.

La figure 1.5 et le tableau 1.6 résument les caractéristiques de ces trois biopolymères.

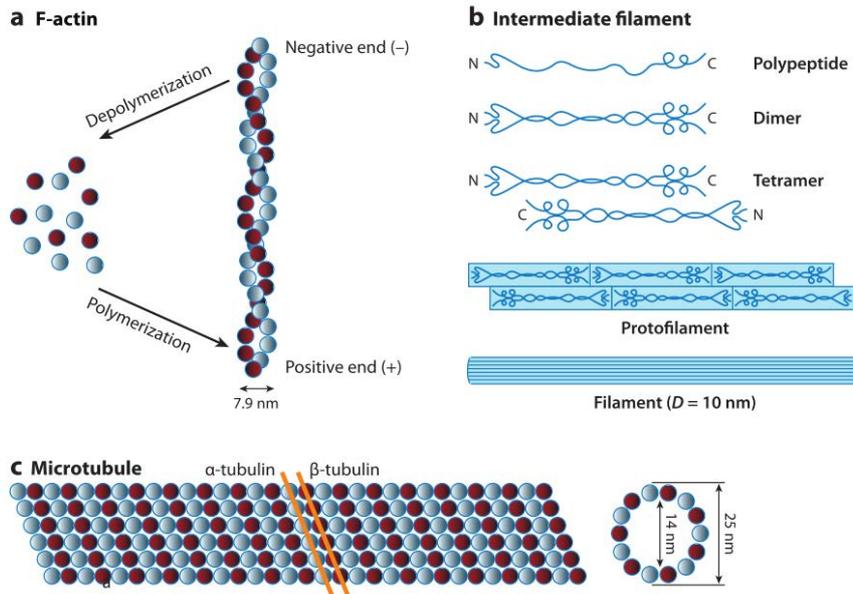


FIGURE 1.5 – Les filaments du cytosquelette. (a) filament d’actine ; (b) filament intermédiaire ; (c) microtubule. D’après [Mofrad, 2009].

Type	Longueur de persistance	Longueur
	L_p	L
Microtubules	5 mm	$L \ll L_p$
filaments d’actine	9 μm	$L < L_p$
Filaments intermédiaires	$\sim 1 \mu\text{m}$	$L \sim L_p$
ADN	50 nm	$L \gg L_p$

FIGURE 1.6 – Longueurs de persistance (L_p) de quelques biopolymères, avec L la longueur entre deux noeuds de réticulation.

1.3 Les filaments d’actine

Nous nous intéressons ici plus en détails aux filaments d’actine. Après une brève description de la protéine d’actine, nous verrons le processus de polymérisation, puis les différentes catégories de protéines partenaires de l’actine permettant de former les structures du cytosquelette.

1.3.1 La protéine

L’actine, l’unité de base constituant l’hélice double brin des microfilaments, est une protéine globulaire de 42 kDa, de diamètre d’environ 5.5 nm, comportant 375 acides aminés (figure 1.7). Elle comporte deux lobes pouvant être divisés en deux sous-domaines ; dans le sillon central vient se fixer un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) et de l’ATP [Kabsch et al., 1990].

une phase où aucun filament ne se forme. Cependant, durant cette période, certains des petits agrégats nucléés parviennent à faire la transition vers une forme filamenteuse plus stable. Il s'ensuit alors une phase d'élongation rapide, pendant laquelle les sous-unités d'actine s'ajoutent rapidement au bout du filament en fonction de la concentration en monomères disponibles ([Wegner and Engel, 1975]). La polymérisation d'un monomère d'actine au bout d'un filament est suivie par une hydrolyse de l'ATP lié à la sous-unité d'actine du filament à un taux de $0,3 \text{ s}^{-1}$ et d'une dissociation du phosphate à un taux de $0,002 \text{ s}^{-1}$. Enfin, le système atteint un état stable dans lequel le taux d'addition d'une nouvelle sous-unité au filament compense exactement le taux de dissociation des sous-unités aux extrémités du filament (voir figure 1.8). La concentration des sous-unités libres en solution à ce point est appelée la concentration critique, C_c . Cette concentration dépend de la concentration en sels et est égale au rapport des constantes cinétiques de dissociation et d'association : $C_c = k_{off}/k_{on}$.

La phase initiale de latence peut être éliminée si des agrégats préexistants sont ajoutés à la solution au début de la réaction de polymérisation. Au sein de la cellule, des protéines nucléatrices catalysent la nucléation de filaments à des endroits spécifiques, ce qui détermine l'emplacement où des nouveaux filaments du cytosquelette sont assemblés (voir section 1.3.3). En effet, la régulation de la nucléation de nouveaux filaments est un des processus principaux que la cellule utilise pour localiser la polymérisation de l'actine à certains endroits.

La structure globulaire de l'actine est non symétrique : on distingue une face "barbée" (+) et une face "pointue" (-). Dans les filaments, les faces barbées sont toutes orientées dans la même direction, ce qui confère une polarité aux filaments d'actine. Les cinétiques d'association et de dissociation sont différentes aux deux extrémités et la polymérisation est favorisée à l'extrémité barbée. Ceci se traduit par une différence de concentration critique (concentration en actine-G au-delà de laquelle les monomères s'ajoutent à l'extrémité en question), et donc à une dynamique de polymérisation particulière : le treadmilling (tapis roulant) ([Wegner, 1976]). En effet, on atteint une concentration intermédiaire entre la concentration critique de l'extrémité (-) et celle de l'extrémité (+), avec $C_c(-) > C_c(+)$. Ainsi, à cette concentration, les sous-unités s'assemblent au bout barbé (+) et se dissocient au bout pointu (-) à un taux identique. Le polymère maintient une longueur constante, même s'il y a constamment de la polymérisation et de la dépolymérisation qui s'opère. Il s'agit d'un état hors équilibre puisqu'il y a consommation d'énergie sous forme d'hydrolyse de l'ATP lié aux monomères peu de temps après leur incorporation au filament. Des modèles cherchent à expliquer que cette transformation chimique en énergie mécanique joue un rôle crucial dans la génération de force par les filaments d'actine (ce dernier point sera développé en section 2.3).

1.3.3 Les partenaires de l'actine

Dans les cellules, l'assemblage de l'actine est contrôlé afin de former le bon réseau de filaments, au bon endroit et au bon moment. Un certain nombre de protéines régulatrices intervient

pour réguler la nucléation des filaments, leur élongation et leur désassemblage, ainsi que leur organisation les uns par rapport aux autres et par rapport à leur environnement.

Avant de donner quelques exemples des protéines régulatrices les plus étudiées, et en gardant à l'esprit que nombre d'entre elles ont plusieurs activités régulatrices, on peut schématiquement grouper leurs activités comme suit. Initialement, les filaments doivent nucléer, et la nucléation à partir d'actine-G pure est limitée par l'instabilité des dimères et des trimères, qui sont des passages obligés pour former des tétramères, qui sont plus stables et qui peuvent être vus comme de petits filaments ([Sept and McCammon, 2001]). Les protéines peuvent ainsi inhiber la nucléation en empêchant la formation de dimères ou de trimères d'actine (ex : profiline), ou favoriser la nucléation en les stabilisant (ex : formines, protéines multi-WH2). Ensuite, les filaments doivent s'allonger, principalement par leur bout barbé. L'élongation peut être régulée par des protéines qui interagissent avec le bout barbé, comme les formines qui suivent le bout barbé pour accélérer l'élongation, ou les protéines de coiffe qui se lient au bout barbé et arrêtent l'élongation. Également, des filaments existants peuvent être stabilisés et maintenus, ou doivent être désassemblés car ils ne sont plus nécessaires. En plus des protéines qui ciblent les bouts des filaments, cette régulation peut s'effectuer par des protéines qui s'attachent aux côtés des filaments pour les renforcer (ex : tropomyosine) ou pour les fragmenter (ex : ADF/cofiline). Les protéines qui s'attachent aux côtés des filaments peuvent aussi connecter les filaments entre eux, contribuant ainsi à la structure globale du réseau, ainsi que générer des forces (myosines) en déplaçant les filaments les uns par rapport aux autres. La figure 1.9 présente quelques-unes de ces protéines.

Les protéines régulatrices concourent souvent pour un même site d'attache sur l'actine-G ou l'actine-F ; ainsi elles régulent elles-mêmes l'action des autres protéines régulatrices. Comme nous le verrons plus loin avec l'exemple des réseaux d'actine branchés, la combinaison de différentes protéines régulatrices est nécessaire pour former les structures complexes observées dans les cellules. Nous donnons ici quelques exemples des protéines régulatrices de l'actine les plus étudiées.

La profiline

La profiline ([Yarmola and Bubb, 2006]) permet de réguler la quantité d'actine G présente dans le cytoplasme en se fixant au bout barbé de l'actine G, empêchant ainsi la formation de trimères et inhibant la nucléation de filaments. L'actine fonctionnalisée ne peut ainsi pas se lier au bout pointu d'un filament existant mais peut s'insérer à l'extrémité barbée d'un filament, favorisant ainsi une élongation de cette dernière.

La formine

Les formines ("formin homology proteins") sont un groupe de protéines impliquées dans la polymérisation rapide de l'actine qui s'associent aux bouts barbés des filaments. Ce sont des protéines multi domaines qui interagissent avec diverses protéines du cytosquelette ([Paul and Pollard, 2009]). Le domaine FH2 a l'aspect d'un anneau qui encercle le bout barbé d'un filament

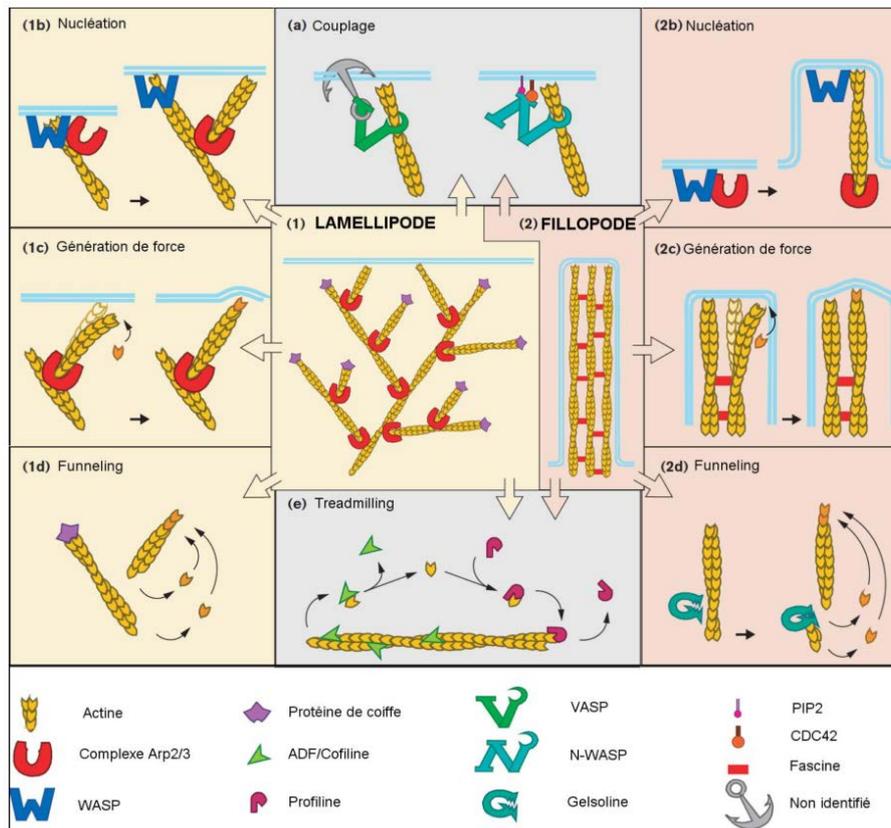


FIGURE 1.9 – Les partenaires de l'actine. D'après [Borisy and Svitkina, 2000]

d'actine, le maintenant et empêchant des interactions avec d'autres protéines ([Otomo et al., 2005]). Le domaine FH1 peut capturer plusieurs monomères d'actine-G avec de la profiline et les ajouter au bout barbé, ce qui accélère la polymérisation ([Vavylonis et al., 2006]). Dans la cellule, ces protéines interviennent par exemple aux bouts des filipodes ou dans les adhésions focales.

Les multiples domaines WH2

Le domaine WH2 ("WASP Homology 2") s'attache à l'actine et est présent dans de nombreuses protéines. Ces dernières peuvent nucléer des filaments, probablement en stabilisant les oligomères d'actine grâce à leurs multiples sites de liaison, mais les détails de ces mécanismes ne sont pas clairs.

Les protéines de coiffe

Il existe des protéines qui coiffent le bout barbé d'un filament, bloquant ainsi l'ajout et le désassemblage de monomères. On peut citer par exemple gelsoline ou capZ. La gelsoline ([Silacci et al., 2004]) est une protéine de coiffe qui peut aussi couper les filaments d'actine. En présence d'actine-G, la gelsoline forme un complexe avec deux monomères d'actine, qui peut toujours coiffer mais pas couper les filaments.

Les protéines de fragmentation

Les ABP destabilisatrices se lient aux sous-unités d'un filament et modifient l'énergie de liaison des monomères entre eux. Les principales protéines de fragmentation des filaments sont l'ADF cofiline et la gelsoline.

L'ADF (Actin Depolymerization Factor, aussi appelée Cofiline) est souvent impliquée dans le désassemblage des structures d'actine-F dans les cellules. L'ADF s'accroche sur le côté des filaments d'actine, préférentiellement sur l'actine-ADP, et de manière coopérative (ie. l'association de l'ADF sur un site favorise l'association sur les sites voisins), ce qui conduit à la formation de long domaines décorés d'ADF. Les filaments décorés d'ADF sont plus flexibles, à la fois en torsion et en flexion, et ont un pas d'hélice altéré [Prochniewicz et al., 2005, McCullough et al., 2008]. La fragmentation intervient aux frontières entre les régions recouvertes d'ADF et les régions nues ([Suarez et al., 2011]) suite au recrutement d'Aip1 par l'ADF/cofiline ([Gressin et al., 2015]).

Les protéines de réticulation

Les protéines de réticulation (crosslink) organisent le réseau en liant les filaments entre eux. Elles ont en commun d'avoir au moins deux sites d'interaction avec l'actine distants l'un de l'autre ce qui leur permet d'interagir avec deux filaments en même temps. C'est la géométrie et la concentration des protéines de réticulation présentes dans le réseau d'actine qui déterminent son architecture. Dans cette famille, on peut nommer l' α -actinine, la fascine (qui forme des fagots), la viline, la fimbrine.

Les myosines

Les myosines sont une famille de moteurs moléculaires se liant à l'actine ([Sweeney and Houdusse, 2010, Veigel and Schmidt, 2011]). Elles s'attachent sur les côtés des filaments, et avancent dans une direction spécifique (vers le bout pointu ou le bout barbé). Chaque pas correspond à un changement de conformation de la protéine motrice, qui est liée à un changement d'état de son nucléotide. Ainsi, les myosines convertissent de l'énergie chimique (ATP) en force mécanique et en mouvement. Certains moteurs (par exemple les myosines V) sont processifs et peuvent transporter des charges le long d'un filament. Les myosines II n'ont pas cette capacité, mais plusieurs myosines II peuvent former des "filaments de myosine", qui peuvent interagir simultanément avec différents filaments d'actine, les déplaçant les uns par rapport aux autres. Ce mouvement global génère une contraction, et cette machinerie contractile formée de myosines II et de filaments d'actine est appelée "actomyosine". Elle agit par exemple dans le cortex ou dans les fibres de stress.

Le complexe Arp2/3 et les réseaux de filaments branchés

Arp2/3 est un complexe de sept protéines ([Goley and Welch, 2006]) comprenant deux protéines (Arp2 et Arp3) qui sont très similaires à l'actine. Quand il est activé et lié à un filament d'actine, le complexe Arp2/3 agit comme le point de départ d'un nouveau filament poussant depuis le filament "mère" comme une branche, avec un angle bien défini de 70°. Arp2/3 est

activé par une famille de complexes de protéines appelées Nucleation Promoting Factors (NPFs - e.g., WAVE, WASP, WASH) ([Campellone and Welch, 2010]) qui contiennent un ou plusieurs domaines WH2 qui peuvent se lier à l'actine, ainsi qu'un connecteur (C) et un domaine acide (A) qui peut se lier à Arp2/3. L'auto-inhibition de N-WASP (son état *in vivo* à l'état neutre) s'arrête avec l'activation par PIP_2 et des protéines comme cdc42 et Rac, qui attachent les NPFs à la membrane, par exemple au sein du lamellipode.

1.4 Le cytosquelette d'actine

In vivo, les filaments d'actine sont organisés en mésostructures pouvant générer et/ou résister à des contraintes mécaniques. L'arrangement des filaments les uns par rapport aux autres et donc l'architecture des réseaux d'actine dépend des partenaires impliqués et confère à la structure des propriétés mécaniques différentes [Fletcher and Mullins, 2010]. Les ABP vues précédemment sont ainsi capables d'organiser les filaments d'actine sur des distances pouvant aller jusqu'à la taille de la cellule uniquement via des interactions à l'échelle moléculaire. Nous présentons ici les principales structures du cytosquelette d'actine. La figure 1.10 en donne une vision schématique.

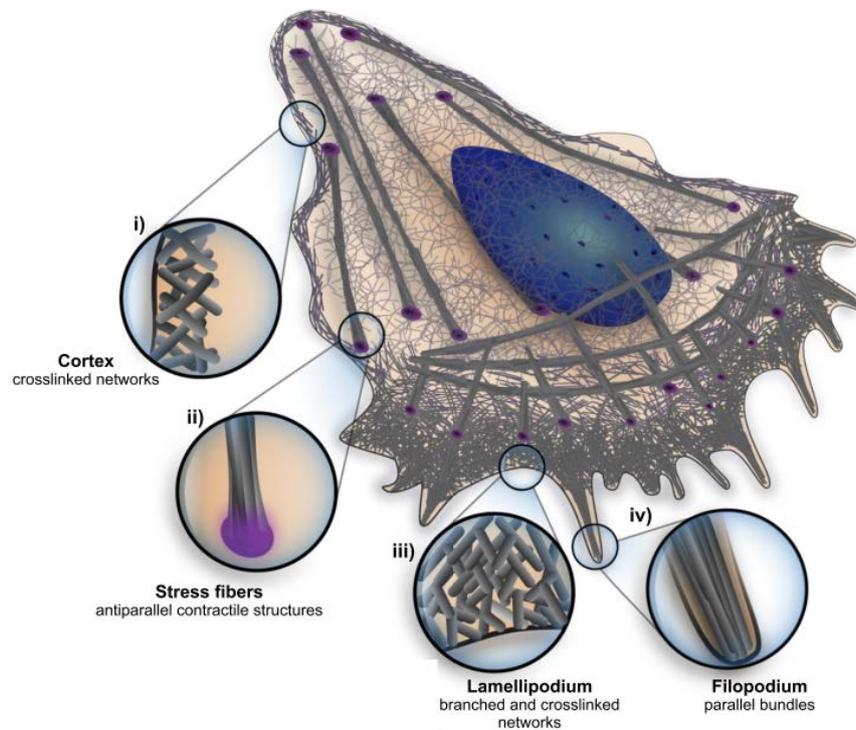


FIGURE 1.10 – Représentation schématique des différentes architectures de l'actine au sein de la cellule. i) le cortex ; ii) un exemple de fibre contractile, la fibre de stress ; iii) le lamellipode ; iv) un filopode. D'après [Blanchoin et al., 2014]

1.4.1 Cortex

Le cortex d'actine, une fine couche de filaments d'actine réticulés par des ABP et de la myosine, se trouvant sous la membrane cellulaire [Bray and White, 1988], joue un rôle fondamental dans de nombreuses fonctions de la cellule.

Par exemple, le cortex permet aux cellules de changer de forme et de résister à des forces mécaniques. La membrane cellulaire, une bicouche lipidique, est à elle seule incapable d'exercer des forces extracellulaires ou de résister à des contraintes de cisaillement [Hamill and Martinac, 2001] et ne peut donc pas maintenir la forme de la cellule ou contribuer à la déformation sans l'appui du cortex d'actine. Il est également important pour la motilité à la fois en 2D et en 3D.

Le cortex permet aussi le positionnement du fuseau mitotique lors de la mitose par des interactions avec les microtubules astraux [Kunda et al., 2008, Lansbergen et al., 2006]. Également, au cours de la cytokinèse (lorsque les deux cellules filles se séparent) l'intégrité du cortex d'actine apparaît essentielle, parce que la perturbation du cortex d'actine dans les régions polaires d'une cellule en division empêche la progression du sillon de clivage [O'Connell et al., 2001]. En outre, les contractions du cortex pendant la cytokinèse donnent naissance à des petites oscillations de la cellule, et des perturbations de l'intégrité corticale provoquent de grandes oscillations incontrôlées dans toute la cellule conduisant à l'aneuploïdie (i.e la cellule ne contient pas le nombre normal de chromosomes) [Sedzinski et al., 2011].

1.4.2 Les fibres de stress

Les fibres de stress résultent de l'association de filaments d'actine anti-parallèles par des myosines et de l' α -actinine (un crosslinker). Elles forment de longs câbles dans la cellule, connectant les adhésions focales (localisées à la membrane plasmique et connectant la cellule à son substrat) à d'autres adhésions ou à d'autres câbles. Elles sont en tension mécanique, transmettant des forces dans la cellule, et agissant comme une structure contractile en permettant la rétraction de l'arrière de la cellule lors de la migration.

1.4.3 Le lamellipode

Les lamellipodes sont de fines protrusions membranaires en forme de feuilles trouvées à l'avant des cellules mobiles telles que des cellules endothéliales, des neurones, des cellules immunitaires ou des cellules épithéliales. Ces structures sont composées d'un réseau dense et dynamique de filaments d'actine. Les réseaux d'actine du lamellipode ont une structure branchée (voir figure 1.11), ce qui est dû à la présence de l'activateur N-WASP du complexe protéique Arp2/3 sur la membrane plasmique (voir section 1.3.3). Les forces générées par l'assemblage des filaments d'actine à l'avant de la cellule induisent une protubérance de la membrane et la croissance du lamellipode. Ceci a été examiné de manière approfondie dans [Theriot and Mitchison, 1991, Mitchison and Cramer, 1996, Pollard and Borisy, 2003, Carlier et al., 2003, Le Clainche and Carlier, 2008]. Le mécanisme exact de génération de forces est encore en discussion, et différents modèles proposés seront vus en section 2.3.

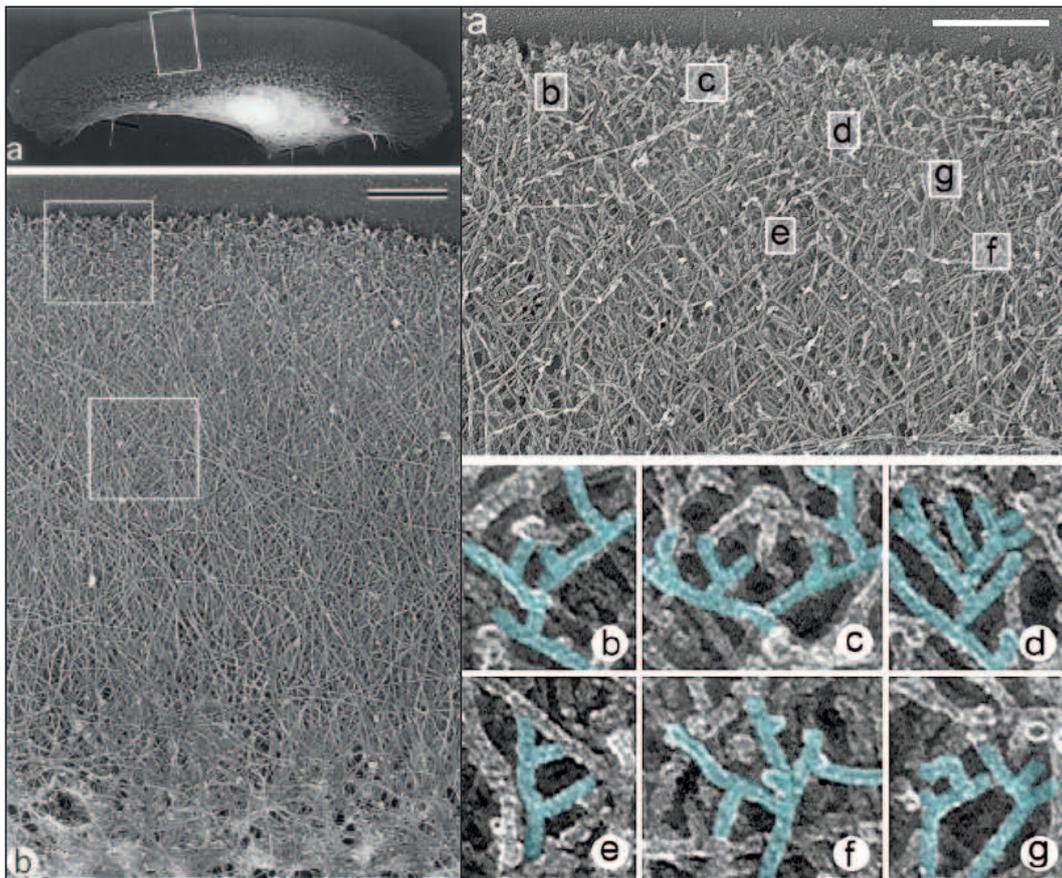


FIGURE 1.11 – Images de microscopie électronique du lamellipode d'un kératocyte. A gauche, a, Vue d'ensemble ; b, Zoom sur le carré dessiné en a, barre d'échelle $1 \mu\text{m}$. D'après [Svitkina et al., 1997]. A droite, a, Front avant de la structure ; b-g Zoom sur les zones indiquées en a, faisant apparaître les différents points de branchement, barre d'échelle $0,5 \mu\text{m}$. D'après [Svitkina and Borisy, 1999].

1.4.4 Les filopodes

Les filopodes sont de fines protrusions longilignes de la membrane qui agissent comme des antennes pour une cellule lui permettant de sonder son environnement [Mattila and Lappalainen, 2008b, Yuan et al., 2003, Davenport et al., 1993]. On les trouve généralement incorporés au lamellipode à l'avant de la cellule. Les filopodes ont généralement un diamètre compris entre 60 et 200 nm et contiennent des fibres parallèles de 10 à 30 filaments d'actine tenus ensemble par des ABP tels que la fascine. Ces filaments sont orientés de manière à ce que leur bout barbé soit dirigé vers la membrane par l'action de la formine.

Les filopodes sondent l'environnement extracellulaire en utilisant des récepteurs de surface [Sheetz et al., 1990, Steketee and Tosney, 2002, Letourneau and Shattuck, 1989]. Le contact avec un élément externe engendre un flux rétrograde d'actine, produisant les forces de traction nécessaires aux processus de migration cellulaire comme la cicatrisation ou la croissance de neurites.

1.5 Reconstitution de gels d'actine branchés *in vitro*

L'étude des structures du cytosquelette d'actine est intéressante pour comprendre la mécanique cellulaire et les processus de génération de forces associés. Pour ce faire, il est aujourd'hui possible de reconstituer certaines de ses structures *in vitro*, ce qui facilite leur étude.

L'identification des protéines suffisantes pour reconstituer un gel d'actine branché *in vitro* de même structure que celui du lamellipode s'est faite à la fin des années 1990, notamment grâce à l'étude de la bactérie *Listeria Monocytogenes*. Cette dernière, après avoir infecté une cellule, a la particularité de synthétiser des protéines activatrices de la nucléation de filaments d'actine à sa surface, créant ainsi une comète de structure semblable au lamellipode qui lui permet de se déplacer dans la cellule à une vitesse pouvant atteindre $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ([Dabiri et al., 1990]), et même de passer d'une cellule à une autre en perçant les membranes, et donc sans passer par le milieu extracellulaire et son système immunitaire (voir figure 1.12) ([Tilney and Portnoy, 1989]).

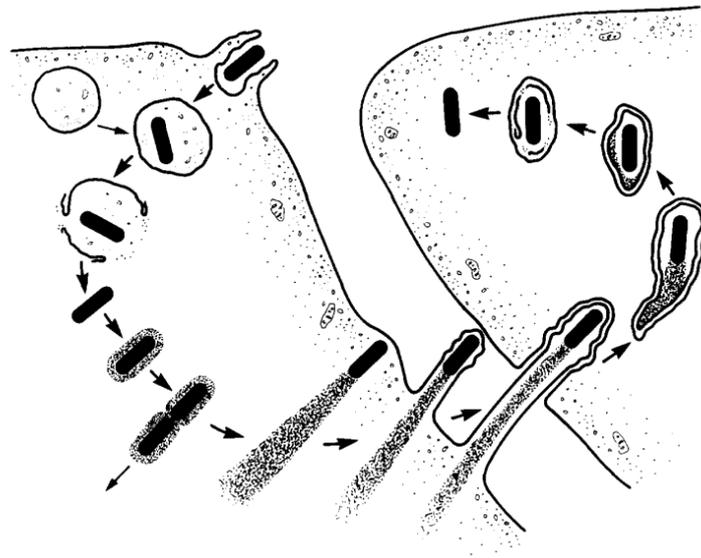


FIGURE 1.12 – Schéma du cycle d'infection par la bactérie *Listeria*. Y sont représentés l'endocytose, la lyse de la membrane, la reproduction, l'utilisation de l'actine et le passage dans la cellule voisine, d'après [Tilney and Portnoy, 1989]

[Cameron et al., 1999] ont réussi à mettre en mouvement une bille de polystyrène fonctionnalisée avec la protéine nucléatrice ActA dans un extrait cellulaire d'oeuf de *Xenopus*. Ceci a montré que la simple polymérisation de l'actine pouvait générer de la motilité. Dans cette dernière expérience, il est possible de faire varier le diamètre des billes et donc la charge contre la comète d'actine, mais peu de variations de la vitesse ont été observées. En parallèle, [Loisel et al., 1999] ont reconstitué la motilité de *Listeria* à partir d'un ensemble minimal de protéines purifiées, permettant de générer *in vitro* des comètes d'actine dans des conditions biochimiques contrôlées. [Wiesner et al., 2003] ont quant à eux fait varier la force s'opposant à la comète d'actine (reconstituée à partir d'un mélange de protéines purifiées) en faisant varier la viscosité du milieu en y ajoutant de la méthylcellulose, qui par son poids moléculaire élevé diminue la

diffusion des gros objets, mais peu de variations de la vitesse ont été observées.

Pour reconstituer des gels d'actine *in-vitro*, cinq protéines sont nécessaires : Arp2/3, gelsoline, VCA (un domaine de N-WASP), cofiline et actine. Un mécanisme d'assemblage des gels d'actine en fonction de ces protéines essentielles été largement décrit dans [Pollard and Borisy, 2003] (voir figure 1.13).

La première étape est la nucléation d'un filament à proximité de la surface de croissance. On a vu en section 1.3.2 que la formation d'un noyau stable pouvait être longue due à l'instabilité thermodynamique des premiers agrégats. Les protéines Arp2/3 et VCA permettent de catalyser la formation de nouveaux filaments en créant des noyaux stables à proximité des surfaces fonctionnalisés en VCA. Le gel nucléant à partir d'une surface, il est beaucoup plus dense que ceux reconstitués en solution. Ensuite, lorsque Arp2/3 est activé par le domaine VCA, il se fixe sur un filament pré-existant et nucléé une nouvelle branche qui s'allonge jusqu'à être éventuellement coiffée par la gelsoline. Le filament s'éloigne alors de la surface en étant repoussé par le nouveau gel.

[Achard et al., 2010] rapporte l'observation à la résolution d'un filament d'actine unique de la formation d'un réseau d'actine médié par la machinerie Arp2/3. Dans cette étude, des filaments d'actine appelés "primers" déterminent l'origine de la formation propagatrice et autocatalytique d'un réseau d'actine autour d'une bille. En absence de gelsoline, les réseaux d'actine s'assemblent de manière isotrope avec leur bout barbé poussant vers l'extérieur de la bille. En présence de gelsoline, plusieurs "primers" forment des réseaux indépendants qui fusionnent autour de l'objet pour former une "coquille" externe faite de filaments coiffés et enchevêtrés. En même temps, de nouveaux filaments créés à la surface de la particule initient une contrainte mécanique qui se développe jusqu'à provoquer une brisure de symétrie et générer une force propulsive.

La cofiline est quant à elle nécessaire si on reconstitue les gels à partir d'actine F car elle coupe des filaments en se liant à eux (les portions décorées sont plus souples et donc plus sensibles à l'agitation thermique, ce qui accentue les contraintes sur les parties non décorées et les fragilise), ce qui permet d'avoir le double d'extrémités libres, et donc plus de dépolymérisation qui renouvelle le stock de monomères libres en solution, ce qui catalyse la réaction ([Suarez et al., 2011]).

Conclusion : Le cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la mécanique cellulaire et dans la génération de forces permettant la migration. La possibilité de reconstituer des gels d'actine branchés *in vitro* de même structure que le lamellipode permet d'en étudier ses propriétés et de faire le lien entre l'architecture microscopique des réseaux avec leurs caractéristiques macroscopiques. Le chapitre suivant est consacré aux expériences réalisées jusqu'à aujourd'hui sur des cellules et sur des systèmes *in vitro* permettant d'étudier ces propriétés.

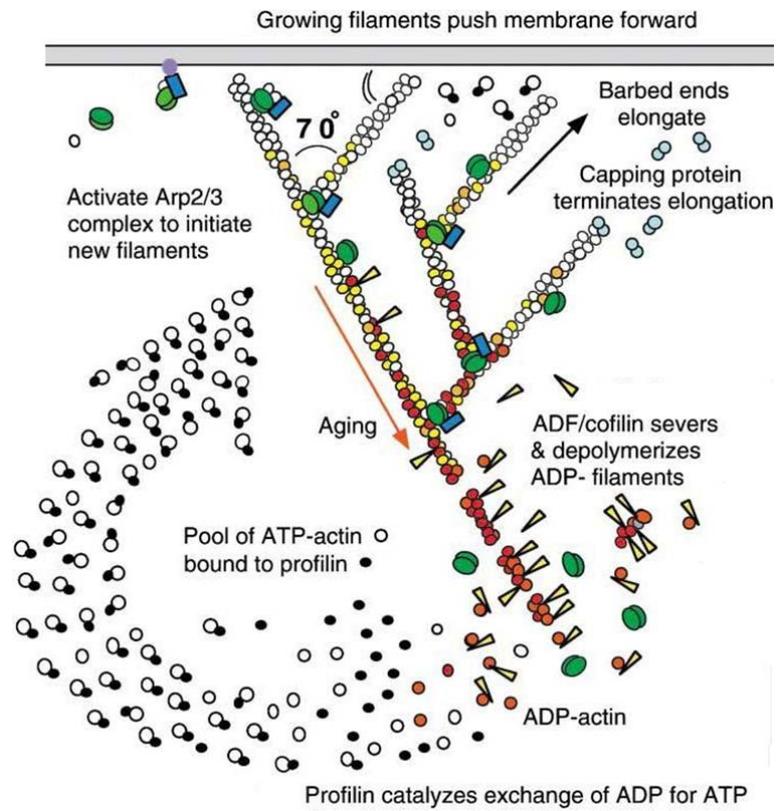


FIGURE 1.13 – Croissance d'un réseau dense et ramifié depuis une surface à partir d'un mix de protéines. D'après [Pollard and Borisy, 2003]

Chapitre 2

Mesures mécaniques en biologie et applications à l'étude du cytosquelette

Sommaire

2.1 Mesures mécaniques et de forces en biologie	29
2.1.1 Différentes méthodes de mesures	30
2.1.2 Méthodes magnétiques	32
2.2 Mécanique des réseaux d'actine	38
2.2.1 Polymères et définitions de quelques grandeurs	39
2.2.2 Travaux théoriques sur les réseaux de polymères semi-flexibles	40
2.2.3 Travaux expérimentaux de rhéologie des réseaux d'actine assemblés en solution	41
2.2.4 Travaux expérimentaux sur des gels d'actine branchés <i>in vitro</i>	43
2.3 Génération de forces	48
2.3.1 Modèle du Brownian ratchet	49
2.3.2 Brownian ratchet élastique	50
2.3.3 Passage à N filaments	50
2.3.4 Modèle auto catalytique - Simulations numériques	52
2.3.5 Travaux préalables	52

Dans ce chapitre nous abordons dans un premier temps différentes techniques de mesures mécaniques et de forces existantes en biologie (section 2.1), avec un accent sur les méthodes magnétiques (section 2.1.2). Ensuite, après un bref rappel de la mécanique des polymères, nous voyons comment la mécanique du cytosquelette a été étudiée au cours des dernières décennies, à la fois de manière théorique et expérimentale (section 2.2). Nous abordons la description des mécanismes de génération de forces (section 2.3) contribuant à la déformation de la membrane et à la migration cellulaire.

2.1 Mesures mécaniques et de forces en biologie

De nombreuses techniques expérimentales ont été développées ces dernières années pour sonder la mécanique et les forces générées par des cellules, des gels de biopolymères, ou même des

filaments ou des molécules uniques. Nous allons brosser le panorama de ces techniques dans cette partie. Les méthodes magnétiques seront abordées dans la section 2.1.2.

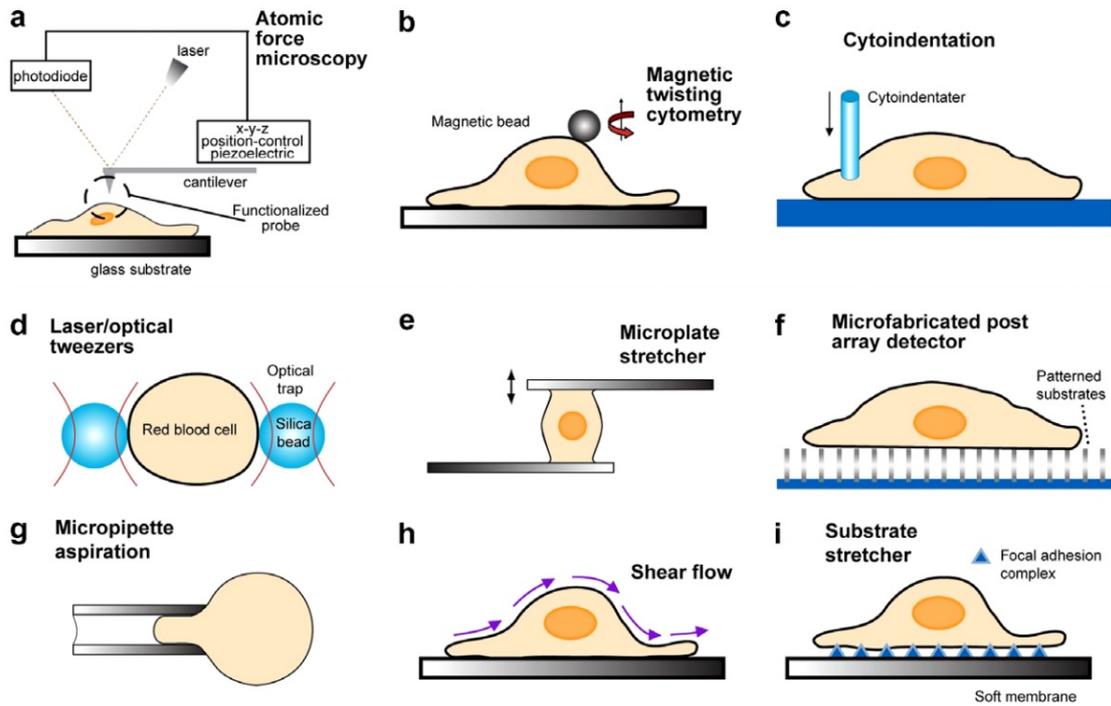


FIGURE 2.1 – Différentes méthodes de mesures de forces en biologie. (a) Microscopie à force atomique; (b) Cytométrie par torsion magnétique (c) Cyto-indentation; (d) Pinces optiques; (e) Microplaques; (f) Déformation de micropiliers (g) Aspiration par micropipette; (h) Flux de cisaillement; (i) Étirement de substrat. D'après [Suresh, 2007]

2.1.1 Différentes méthodes de mesures

Le principe des mesures mécaniques est d'observer la déformation d'un matériau en fonction de la contrainte qu'on lui applique et d'en déduire les propriétés mécaniques.

Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM, [Binnig et al., 1986]) est au départ une technique d'imagerie de surfaces, pouvant atteindre des résolutions sub-nanométriques. La technique est basée sur le contact d'une pointe nanométrique et la surface d'un échantillon. La pointe fine est située au bout d'un cantilever qui est abaissé par un dispositif piezoélectrique jusqu'à ce qu'il rentre en contact avec la surface. Ce contact est détecté par la déflexion d'un laser qui se réfléchit sur le levier, permettant de mesurer la topographie de l'échantillon.

On utilise également cet instrument pour faire des mesures mécaniques en biologie à haute résolution (figure 2.1.a). A l'origine, les mesures en AFM utilisaient des pointes très fines avec un rayon de courbure de l'ordre du nanomètre pour pousser ou tirer la surface de la cellule et ainsi obtenir des informations sur leurs propriétés mécaniques. La structure hétérogène du cytosquelette rend cette méthode moins pertinente, donc plus récemment, les expériences en AFM ont

utilisé des billes de polystyrène au bout de la pointe afin d'avoir une déformation plus homogène au prix d'une moins bonne résolution spatiale. ([Cross et al., 2008]). Les forces exercées avec un tel système sont de l'ordre de la dizaine de nanonewtons. Un tel système permet aussi de venir sonder la mécanique de matériaux biologiques *in vitro*, comme nous le verrons en section 2.2.4.

Avec une approche un peu analogue, la méthode de l'aiguille de verre (glass needle) a été conçue au départ pour des expériences sur des extensions neuronales et utilise de fines aiguilles de verre pour appliquer des forces de l'ordre du nanonewton au maximum. La cellule est sur une lamelle au dessus de l'aiguille de verre préalablement calibrée par une série d'autres fines aiguilles de verre précalibrées ([Heidemann et al., 1999]), elle-même reliée à une tige reliée à un actuateur piezoélectrique. L'actuateur permet de déplacer l'aiguille verticalement et d'indenter la cellule, et la force appliquée est mesurée par la différence de déplacement entre la tige et l'aiguille.

Microplaques

La méthode des microplaques a été développée pour mesurer les propriétés mécaniques de cellules adhérentes à une surface ([Thoumine et al., 1999]). La cellule est cultivée sur une microplaque rigide et une microplaque flexible est placée au-dessus de la cellule. Cette dernière peut être fonctionnalisée pour adhérer à la surface de la cellule. La plaque rigide est ensuite déplacée pour produire de la compression, de l'extension, ou du cisaillement. La mesure de la déflexion de la microplaque flexible permet de mesurer précisément le stress imposé à la cellule (voir figure 2.1.e). Cette méthode a par exemple été utilisée pour étudier la mécanique des fibroblastes et a montré que leur module élastique était de l'ordre de 1 kPa ([Caille et al., 2002, Thoumine and Ott, 1997]).

Piège optique

En piégeant une particule avec un faisceau laser, comme par exemple une bille de silice ou de latex de quelques micromètres de diamètre, attachée à la surface d'une cellule, on peut appliquer des forces locales inférieures à 100 pN (figure 2.1.d). Cette méthode présente plusieurs avantages, comme par exemple la possibilité d'appliquer de très faibles forces, et la possibilité de mesurer des propriétés mécaniques comme la détection de la déformation avec une bonne dynamique temporelle (de l'ordre de 10 ms).

Les pinces optiques sont aussi utilisées pour faire des mesures de forces générées par des moteurs moléculaires sur filaments uniques comme des brins d'ADN ou des microtubules. En piégeant une bille par un faisceau laser sur laquelle est attaché le moteur moléculaire, on peut mesurer les forces générées par ce dernier (figure 2.2).

De nouvelles méthodes de piégeage optique ont été développées pour piéger une cellule unique et lui appliquer des forces d'étirement. Le groupe de Joseph Käs ([Guck et al., 2001]) a développé un "optical stretcher", qui permet de micro-manipuler des cellules uniques non adhérentes et de sonder leurs propriétés viscoélastiques en suspension. Cet outil permet de piéger une cellule

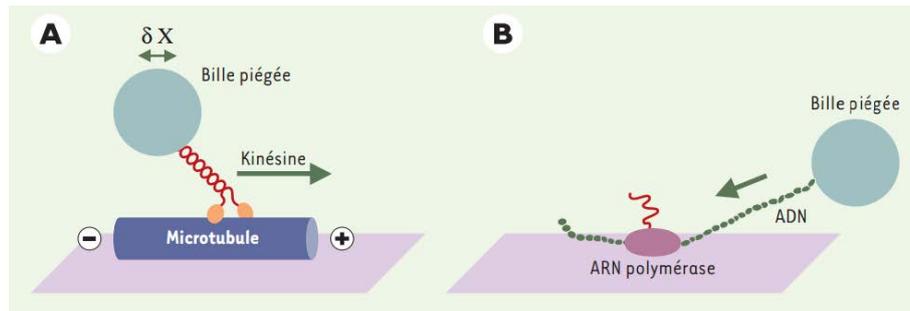


FIGURE 2.2 – Schéma d’une pince optique permettant l’étude d’un moteur moléculaire tel que la kinésine sur un microtubule ou l’ARN polymérase sur un brin d’ADN. D’après [Coirault et al., 2003].

entre deux lasers opposés et divergeants. La lumière applique une contrainte en volume sur la cellule, provoquant une élongation de la cellule le long de l’axe du faisceau laser. Cela permet par exemple de différencier différents types de cellules selon leur élasticité, comme des cellules cancéreuses ([Guck et al., 2005]).

2.1.2 Méthodes magnétiques

La nouvelle méthode que nous présentons dans ce manuscrit étant une méthode magnétique, nous détaillons dans cette section quelques exemples de méthodes magnétiques permettant de sonder les propriétés mécaniques des matériaux biologiques, de générer des forces, ou de faire du piégeage. Nous commençons par un bref rappel sur les propriétés des différents types de matériaux magnétiques.

Classification des matériaux magnétiques

Les matériaux magnétiques présentent la particularité de devenir une source de champ magnétique sous certaines conditions. On peut les classer selon leur moment dipolaire atomique qui peut être permanent (ferromagnétisme, paramagnétisme) ou induit (diamagnétisme). On peut encore subdiviser les matériaux, selon la facilité des dipôles magnétiques à s’orienter dans une même direction. Cette orientation résulte d’un minimum énergétique entre un ensemble d’énergies, dont l’énergie de Zeemann (énergie d’aimantation), l’énergie de couplage d’échange entre chaque moment dipolaire, l’énergie magnétocristalline si la structure est orientée, l’énergie thermique... De manière générale, l’énergie thermique a tendance à agiter les dipôles magnétiques dans toutes les directions, tandis que l’énergie de Zeemann et l’énergie de couplage d’échange tendent à privilégier une direction d’aimantation.

Nous présentons ci-après les principaux matériaux magnétiques et les différentes interactions qu’ils engendrent lorsqu’ils sont plongés dans un champ magnétique excitateur. Nous commencerons par décrire les matériaux ferromagnétiques, puis nous évoquerons ensuite les matériaux paramagnétiques. Les matériaux diamagnétiques ne seront pas décrits dans cette thèse.

Le ferromagnétisme Les atomes des matériaux ferromagnétiques possèdent des moments magnétiques permanents. Du fait des fortes interactions d'échange entre moments proches, l'orientation du moment d'un atome est liée à celle de ses atomes voisins. On observe alors le regroupement des atomes en domaines microscopiques dans lesquels le moment atomique de tous les atomes s'oriente dans la même direction. Ces domaines sont appelés domaines de Weiss. On peut considérer qu'un domaine de Weiss représente un microaimant en lui-même. En l'absence de champ, ces domaines s'orientent de sorte que le matériau présente une aimantation globale nulle. Par contre, en présence d'un champ excitateur, chaque moment tend à s'aligner dans la direction du champ.

Matériaux ferromagnétiques durs Les matériaux ferromagnétiques durs ont une aimantation permanente qui est due à une forte hystérésis de leur aimantation en fonction du champ extérieur appliqué (voir la courbe rouge de la figure 2.3) : les chemins empruntés pour passer d'une aimantation de saturation positive à une aimantation de saturation négative sont différents. Ainsi lorsque le champ excitateur est retiré, ils créent leur propre champ magnétique, dit permanent. Leur aimantation peut être considérée comme rémanente car les domaines de Weiss restent bloqués et ont besoin de beaucoup d'énergie pour rebasculer (e.g. champ inverse supérieur au champ coercitif H_c , température atteignant la température de Curie).

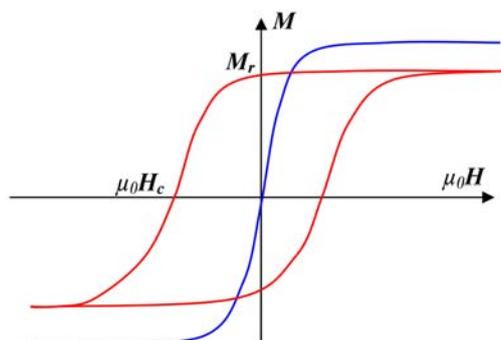


FIGURE 2.3 – Cycles d'hystérésis correspondant aux matériaux doux en bleu et aux matériaux durs en rouge.

Matériaux ferromagnétiques doux Contrairement aux matériaux ferromagnétiques durs, les matériaux ferromagnétiques doux ne présentent pas d'hystérésis de leur aimantation en fonction du champ magnétique extérieur appliqué, ce qui fait que leur aimantation est nulle en l'absence de champ.

On définit la susceptibilité magnétique d'un matériau par :

$$\chi_m = \left. \frac{\partial M_{m,H}}{\partial H} \right)_{H=0} \quad (2.1)$$

avec \vec{M} l'aimantation en ampère par mètre (A/m), χ_m la susceptibilité magnétique (sans dimension) et \vec{H} l'excitation magnétique appliquée, également en ampère par mètre (A/m).

L'aimantation jusqu'à saturation des matériaux doux est réalisée facilement avec un champ magnétique extérieur relativement faible grâce à leur susceptibilité magnétique importante de 100 à 10^5 , comme le montre la courbe bleue de la figure 2.3. Les matériaux doux ont une influence importante sur le champ extérieur car il est énergétiquement beaucoup plus facile pour le champ magnétique de les traverser que de traverser le vide ou l'air (figure 2.4). Ils sont donc très couramment utilisés pour canaliser ou concentrer le champ. Ils permettent d'atteindre un niveau de champ élevé dans la zone de travail (souvent un entrefer pour appliquer des forces).

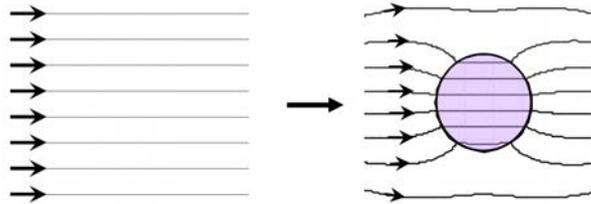


FIGURE 2.4 – (a) Lignes d'induction magnétique en champ uniforme (par exemple le champ magnétique terrestre à notre échelle), (b) modification des lignes d'induction en présence d'un corps ferromagnétique doux.

Paramagnétisme et superparamagnétisme

Les matériaux paramagnétiques : Un matériau paramagnétique contient des atomes magnétiques dont le moment est libre de s'orienter dans n'importe quelle direction. En l'absence de champ, les atomes sont donc dirigés aléatoirement, et par conséquent l'aimantation du matériau est nulle. Lorsqu'un champ magnétique est appliqué, ces moments ont tendance à s'aligner dans le sens du champ magnétique. Les matériaux paramagnétiques ont une susceptibilité faiblement positive à température ambiante ($10^{-4} < \chi < 10^{-3}$) qui est inversement proportionnelle à la température.

Les matériaux superparamagnétiques Le superparamagnétisme est un comportement des matériaux ferromagnétiques lorsque ceux-ci sont réduits à un unique domaine de Weiss, généralement sous la forme d'une nanoparticule. A ces dimensions, les moments des nanoparticules se comportent comme un moment magnétique géant appelé « macro-spin ». En l'absence de champ magnétique extérieur, leur aimantation est nulle comme pour les matériaux paramagnétiques, et en présence d'un champ magnétique excitateur leur aimantation de saturation est atteinte rapidement grâce à leur susceptibilité élevée due aux domaines ferromagnétiques ($\chi \sim 1$ voire $\chi > 1$) qui est bien supérieure à celle du paramagnétisme.

Forces magnétiques

Particule soumise à un champ magnétique : Quand une particule de moment magnétique \vec{m} est placée dans un champ magnétique \vec{H} , l'induction magnétique résultante est

$$\vec{B} = \mu_0 \left(\vec{H} + \frac{\vec{m}}{V} \right) \quad (2.2)$$

où μ_0 est la perméabilité du vide et V le volume de la particule. Cette dernière est soumise à un couple

$$\vec{\tau} = \vec{m} \times \vec{B} \quad (2.3)$$

qui tend à aligner le moment magnétique avec le champ. S'il y a un gradient de champ $\vec{\nabla} \vec{H}$, la particule subit la force

$$\vec{F} = (\vec{m} \cdot \vec{\nabla}) \vec{B} \quad (2.4)$$

dirigée vers les régions de grande densité de champ (ce qui est illustré en figure 2.5 pour une particule superparamagnétique).

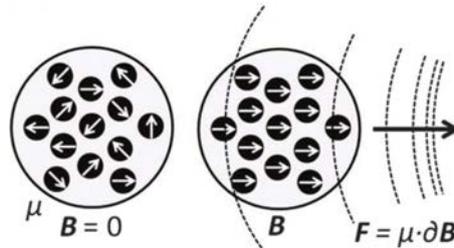


FIGURE 2.5 – Les billes superparamagnétiques contiennent des nanoparticules magnétiques dont les moments magnétiques sont orientés aléatoirement. Dans un champ magnétique non homogène, ces domaines s'alignent avec le gradient de champ et une force est générée. D'après [Kilinc and Lee, 2014]

Les forces dipolaires : Des particules superparamagnétiques soumises à un champ magnétique homogène acquièrent une magnétisation importante et deviennent des dipôles magnétiques de moment dipolaire $\vec{m} = V_{part} \times \vec{M}$, avec V_{part} le volume de la particule et \vec{M} son aimantation. L'interaction dipôle-dipôle entre deux particules isolées a pour expression :

$$F_{mag} = \frac{3\mu_0}{4\pi d^4} m^2 (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (2.5)$$

avec μ_0 la permittivité du vide, d la distance centre à centre entre les particules et θ l'angle de leur alignement par rapport au champ magnétique. Quand les particules sont alignées avec le champ, l'expression de la force devient :

$$F_{mag} = \frac{3\mu_0}{2\pi d^4} m^2 \quad (2.6)$$

Nous allons maintenant donner quelques méthodes magnétiques utilisées ces dernières années pour faire des mesures de forces en biologie.

Principe des pinces magnétiques

Des microbilles paramagnétiques ou ferromagnétiques peuvent être manipulées par des gradients de champ magnétique et utilisées pour exercer des forces de compression, de traction ou de torsion, à la surface d'une cellule ou dans l'environnement intracellulaire (figure 2.1.b), ou directement sur des matériaux biologiques *in vitro* ([Karcher et al., 2003, Fabry et al., 2001]).

Les pinces magnétiques sont utilisées pour générer des forces et des couples allant de la dizaine de piconewtons à la dizaine de nanonewtons pour mesurer les propriétés mécaniques d'échantillons biologiques, allant de la molécule unique, ([Manosas et al., 2012], figure 2.6.A) aux liaisons inter moléculaires ([Min et al., 2013]) et aux cellules entières ([Saphirstein et al., 2013], figure 2.6.B).

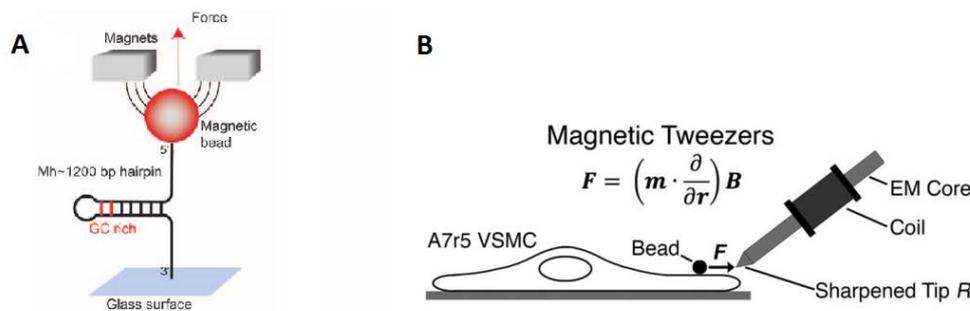


FIGURE 2.6 – A : Expérience de pince magnétique sur un brin d'ADN, permettant d'appliquer des forces de compression ou d'extension contrôlée pour étudier les forces mises en jeu dans les fourches de réplication de l'ADN. D'après [Manosas et al., 2012]. B : Mesures de la rigidité du cortex cellulaire par pinces magnétiques : des impulsions de forces contrôlées générées par pince magnétique déplacent une bille superparamagnétique ($2.8\mu\text{m}$ de diamètre) attachée à la surface de la cellule, ce qui permet de mesurer sa rigidité. D'après [Saphirstein et al., 2013].

Un des avantages majeurs des pinces magnétiques par rapport aux autres méthodes biophysiques est qu'elles sont actionnées à distance par le champ ce qui limite les interférences avec le système étudié, exemple particulièrement important dans les études de méchanotransduction.

Exemple de mesures massivement parallèles de mécanique cellulaire par des nanoparticules magnétiques

Une deuxième méthode intéressante est celle développée dans [Tseng et al., 2012], qui rapporte une technique permettant de générer des forces contrôlables, variables dans le temps et localisées, sur des surfaces contenant des cellules, et ce de façon massivement parallèle. Pour réaliser ceci, des cellules contenant des nanoparticules magnétiques sont cultivées sur des motifs pré-définis sur des substrats micromagnétiques. Ils appliquent des forces médiées par les nanoparticules localisées, appliquant une tension sur le cortex de cellules HeLa (une lignée cellulaire cancéreuse utilisée en biologie cellulaire et en recherche médicale). Ils observent des réponses cellulaires très coordonnées. Un échantillon de grande taille et de fabrication simple permet l'analyse de cellules à un taux inégalé jusqu'ici : dans une expérience, potentiellement des dizaines de mil-

liers de cellules peuvent être stimulées pour une grande précision statistique dans les mesures (voir figure 2.7).

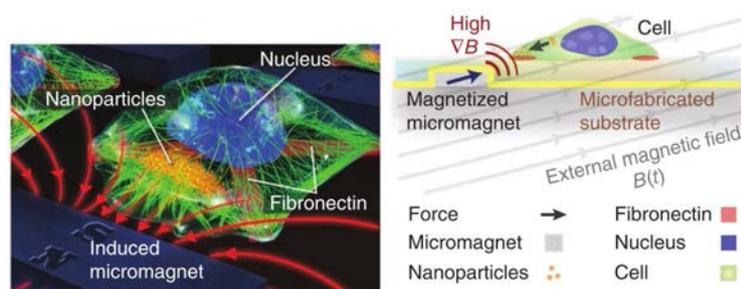


FIGURE 2.7 – Localisation parallèle et dynamique de clusters de nanoparticules magnétiques au sein d'un tableau de cellules. Schémas de la plateforme de génération de force. Un aimant permanent commandé magnétise les éléments ferromagnétiques à proximité de cellules cultivées sur lde la fibronectine, faisant coalescer les nanoparticules magnétiques en clusters exerçant une force à l'intérieur de chaque cellule. D'après [Tseng et al., 2012]

Méthode de fabrication de micro-aimants

Ce troisième exemple rapporte des travaux récents développés à l'Institut Néel, qui consistent à réaliser des microaimants.

Le Thermo-Magnetic Patterning Un processus de structuration appelé le « Thermo-Magnetic Patterning » (TMP) permet d'obtenir des réseaux d'aimants plats permanents ([Dumas-Bouchiat et al., 2010]).

Un film magnétique de Néodyme-Fer-Bore (NdFeB) est déposé par pulvérisation cathodique triode sur un wafer en silicium (figure 2.8). Initialement, ce film d'épaisseur $5 \mu\text{m}$ est aimanté à saturation dans une direction. Des micro-motifs magnétiques de géométrie bien définie peuvent alors être obtenus à partir de ce film grâce à la technique TMP qui consiste à exploiter la dépendance de la coercitivité à la température pour inverser localement l'aimantation. Un masque est posé sur le film que l'on irradie pendant quelques nanosecondes à l'aide d'un laser pulsé. Le laser sert ici à chauffer la couche magnétique sur certaines parties, correspondant aux ouvertures du masque. La coercitivité va ainsi diminuer localement dans les zones irradiées. Durant l'irradiation, un champ magnétique externe de direction opposée à la direction initiale d'aimantation du film de NdFeB est appliqué, ce qui permet de renverser localement l'aimantation au niveau des zones chauffées par le laser. On obtient ainsi une juxtaposition de zones d'aimantation opposées constituant un réseau de micro-aimants alternés.

La géométrie des micro-aimants dépend du masque apposé sur le film magnétique durant l'irradiation au laser. Tout type de géométrie de masque peut être utilisé (ex : bandes, cercles, damiers...) dans la limite où la diffusion de la chaleur ne s'effectue pas de manière latérale sur la surface magnétique (ce qui élargirait le motif) mais uniquement en profondeur.

Applications en biologie Cette méthode permet de générer des gradients magnétiques pouvant capturer des nanoparticules et des microparticules magnétiques éventuellement présentes dans le cytoplasme ou dans des liposomes ([Osman et al., 2012]). Les objets magnétiques sont piégés aux frontières entre les micro-aimants, là où le gradient de champ est maximum (figure 2.8 à droite A et B). Ceci a l'avantage de ne pas nécessiter de champ magnétique extérieur, et permet de faire des expériences aux temps longs. [Osman et al., 2012] rapporte ainsi une étude des processus liés à l'endocytose dans des cellules.

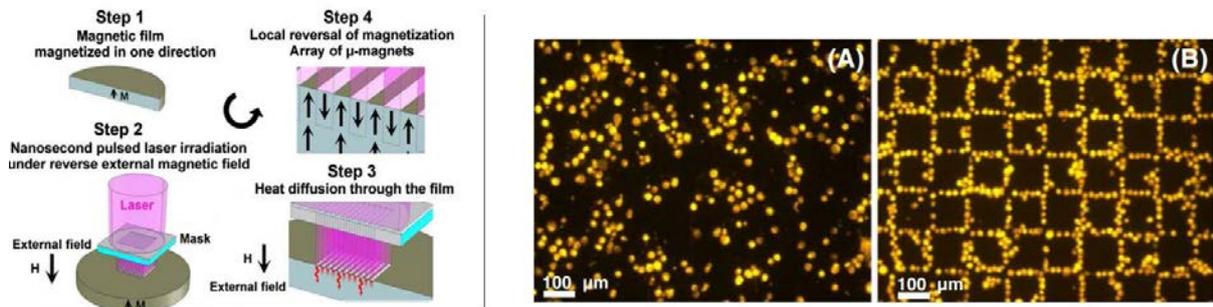


FIGURE 2.8 – Gauche : Schéma du processus de fabrication des micro-aimants, d'après [Dumas-Bouchiat et al., 2010]. Droite : Images de fluorescence de cellules (en jaune) déposées sur un réseau de micro-aimants de dimensions $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. (A) Cellules ne contenant pas de particules magnétiques. (B) Cellules ayant été incubées dans un milieu contenant des nanoparticules magnétiques, d'après [Osman et al., 2012].

Une autre méthode consiste à fabriquer des réseaux de micro-aimants de NdFeB pour créer des pièges diamagnétiques permettant de faire léviter des cellules ([Kauffmann et al., 2011]). Ceci permet d'étudier les propriétés des cellules non adhérentes comme par exemple les cellules sanguines qui circulent dans les artères et les veines.

Nous allons maintenant voir comment la mécanique du cytosquelette a été étudiée au cours des dernières décennies, à la fois de manière théorique et expérimentale (section 2.2). Nous abordons enfin les mécanismes de génération de forces (section 2.3) contribuant à la déformation de la membrane et à la migration cellulaire.

2.2 Mécanique des réseaux d'actine

On a vu au chapitre précédent que la mécanique des réseaux d'actine joue un rôle clé en mécanique cellulaire. Après un bref rappel des propriétés des polymères, nous verrons quelles expériences ont été conduites ces dernières années pour étudier ces propriétés.

2.2.1 Polymères et définitions de quelques grandeurs

Les polymères sont des chaînes constituées par la répétition d'un motif élémentaire appelé monomère. Pour former un matériau, ces chaînes peuvent être emmêlées (polymères enchevêtrés) ou présenter des liaisons chimiques entre chaînes (polymère réticulés).

Au quotidien, on retrouve de nombreux polymères synthétiques issus de la transformation du pétrole, comme par exemple le polyéthylène, le polychlorure de vinyle, le polystyrène, etc. Beaucoup sont des élastomères : ils présentent une élasticité dite caoutchoutique d'origine entropique due à la structure microscopique de ces matériaux constitués de chaînes flexibles de polymères.

En biologie, on retrouve également différents polymères, comme la fibrine, le collagène, ou l'actine. Cependant, contrairement à de nombreux polymères synthétiques composés de chaînes flexibles, les filaments d'actine sont eux composés de chaînes semi-flexibles, qui sont un cas intermédiaire entre les polymères flexibles et les filaments rigides. Cela a pour conséquence de changer le comportement macroscopique des matériaux qu'ils forment en leur conférant en particulier une élasticité fortement non-linéaire ([Mackintosh, Käs, Janmey, 1995]).

Le module d'Young et le module différentiel

Pour rappel, une des grandeurs permettant de caractériser la mécanique d'un matériau est le module d'Young, ou module élastique macroscopique du matériau, qui lie la contrainte appliquée ($\underline{\sigma}$) à la déformation ($\underline{\epsilon}$) lorsque l'on soumet le matériau à une déformation.

$$\underline{\sigma} = E \cdot \underline{\epsilon} \quad (2.7)$$

Les métaux ont généralement un module d'Young de l'ordre du gigapascal, tandis qu'on est plutôt de l'ordre du mégapascal pour les élastomères. On verra par la suite que cette valeur est plus faible pour les réseaux du cytosquelette.

Pour caractériser les propriétés mécaniques des matériaux non-linéaires, on détermine leur module différentiel $K = \frac{d\sigma}{d\epsilon}$, avec K le module différentiel, σ la contrainte et ϵ la déformation, obtenu en appliquant une précontrainte sur le matériau et en faisant des petites oscillations sinusoïdales autour de ce point. Les deux modules sont représentés en figure 2.9.

Longueur de persistance

La longueur de persistance (L_p) est une propriété intrinsèque d'un polymère permettant d'en caractériser la rigidité. Il s'agit de la longueur typique sur laquelle le polymère garde son orientation malgré les déformations dues à l'agitation thermique. Plus formellement, c'est la longueur au bout de laquelle la corrélation entre la direction des angles tangents est perdue dans un espace à trois dimensions. C'est donc une caractéristique propre à chaque polymère. Le

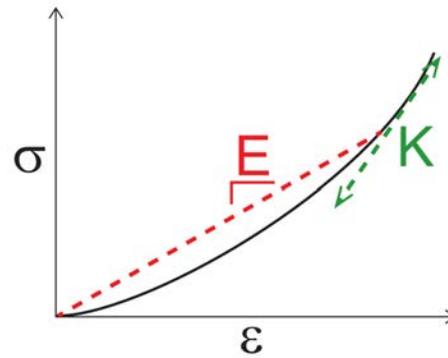


FIGURE 2.9 – Courbe contrainte-déformation d'un matériau non linéaire. On y voit les différences entre le module d'Young et le module différentiel.

module de flexion (κ) est lié à la longueur de persistance par $\kappa=L_p k_B T$ avec k_B la constante de Boltzmann et T la température.

Polymères flexibles, semi-flexibles et rigides

En notant L la longueur d'un filament (ou longueur de contour), on peut classer les polymères en diverses catégories selon le rapport L/L_p :

- Pour $L \ll L_p$: Les filaments sont rigides. Ils ne sont pas sujets aux fluctuations thermiques et se déforment comme des fibres rigides.
- Pour $L \gg L_p$: Les filaments sont flexibles, les monomères prennent n'importe quelle orientation les uns par rapport aux autres et l'agitation thermique les conduit à adopter une forme de pelote.
- Pour $L \sim L_p$: Les filaments sont semi-flexibles, c'est un régime intermédiaire entre rigide et flexible : bien qu'ils aient la forme de fibres rigides, ils peuvent se courber et se déformer sous agitation thermique.

2.2.2 Travaux théoriques sur les réseaux de polymères semi-flexibles

Beaucoup de travaux théoriques ont été menés pour décrire le comportement mécanique des réseaux d'actine à partir de la mécanique des filaments. Les modèles dépendent de plusieurs longueurs caractéristiques : la longueur de persistance, L_p , la taille de la maille du réseau ξ , et la longueur typique sur laquelle les filaments se déforment dans le réseau L_c . L_p a été mesurée expérimentalement pour l'actine ([Isambert et al., 1995]) et ξ peut être calculée à partir de la concentration en actine ($\xi=\sqrt{ac}$ [De Gennes, 1974], avec a la taille de la maille et c la concentration d'actine). Il est par contre plus difficile de déterminer L_c [Bausch and Kroy, 2006] : dans un réseau simplement enchevêtré c'est la longueur d'enchevêtrement tandis que dans un réseau fortement réticulé c'est la distance entre points de réticulation.

Pour les réseaux dilués, les principaux modèles décrivent les modes de déformation des filaments en réponse à une sollicitation globale du réseau comme des modes d'élongation entropique dans lesquels les filaments résistent à la déformation en déployant l'excès de longueur stocké par

les fluctuations thermiques [Mackintosh, Käs, Janmey, 1995]. Le module élastique s'écrit alors :

$$E = k_b T \left(\frac{L_p^2}{L_c^3 \xi^2} \right) \quad (2.8)$$

Pour faire apparaître la dépendance en concentration en actine, c , on peut utiliser la relation entre c et ξ ce qui donne une dépendance en $c^{11/5}$ ou $c^{5/2}$ selon l'expression choisie pour la longueur L_c . Dans ce mode de déformation, les filaments d'actine sont considérés comme semi-flexibles ; ils sont proches de leur extension totale, et même à petites déformations des réponses non linéaires peuvent apparaître. Les résultats expérimentaux ci-dessous ([?], figure 2.10) s'interprètent bien dans ce cadre.

D'autres modèles ont été proposés pour décrire l'élasticité de gels de polymères dans lesquels les filaments sont considérés comme des barres rigides. Ils pourraient s'appliquer aux réseaux d'actine quand les tailles typiques du réseau deviennent beaucoup plus petites que la longueur de persistance L_p . Ces modèles sont désignés sous le terme global d'enthalpique car ils considèrent les déformations des filaments eux-mêmes soit en flexion [Joly-Duhamel et al., 2002] soit en compression / extension [Head et al., 2003]. On peut réécrire les dépendances du module élastique en fonction de L_p , ξ et L_c pour les déformations en flexion :

$$E = k_b T \left(\frac{L_p}{L_c^2 \xi^2} \right) \quad (2.9)$$

et en extension / compression (avec a le diamètre du filament) :

$$E = k_b T \left(\frac{L_p}{a^2 \xi^2} \right) \quad (2.10)$$

Contrairement au mode entropique, ces modes de déformation n'induisent pas de non linéarités fortes (le mode entropique a une forte non linéarité car les filaments étant proches de leur extension maximale le nombre de configurations accessibles chute drastiquement à faibles déformations). En revanche, les modes de déformation en flexion induisent des comportements non affines dans lesquels les déformations peuvent être hétérogènes spatialement ce qui complique leur étude [Wen et al., 2012]. Ce domaine a une forte activité théorique et numérique actuellement. Plusieurs groupes dont ceux de Fred MacKintosh et Alex Levine étudient les diagrammes de phase à l'origine de l'élasticité dans les réseaux de fibres.

L'équipe de MacKintosh aux Pays-Bas a proposé une étude théorique et numérique qui prévoit une coexistence entre les modes de flexion et de compression / extension [Broedersz, 2011] et indique une dépendance de E en $1/L_c$.

2.2.3 Travaux expérimentaux de rhéologie des réseaux d'actine assemblés en solution

De nombreux groupes ont développé des dispositifs expérimentaux permettant d'étudier des gels d'actine in vitro. Nous allons tout d'abord étudier la mécanique des gels en solution, avant de se pencher plus précisément sur la mécanique de gels qui ont poussé à partir d'une surface.

Rhéologie des réseaux d'actine assemblés en solution

L'étude des propriétés élastiques de gels d'actine reconstitués *in vitro* a débuté au milieu des années 1980 avec des mesures rhéologiques classiques en solution en absence des partenaires protéiques de structure (en sollicitant des gels polymérisés en solution dans un rhéomètre, ou par micro-rhéologie en observant la diffusion de particules colloïdales incorporées au gel avant la polymérisation). Pour ces gels enchevêtrés, les valeurs de modules obtenues sont de l'ordre de 0,01 à 0,1 Pa ([Xu et al., 1998]).

Par la suite, les propriétés mécaniques de solutions d'actine en présence d'agents réticulants, naturels ou non, ont été testées avec la même méthode ou par des techniques de microrhéologie et les modules élastiques mesurés s'étendent de 0,1 à 300 Pa selon la concentration en actine, la quantité d'agent réticulant, sa mécanique propre et le type d'arrangement spatial ([Gardel et al., 2006, Bathe et al., 2008, Claessens et al., 2006, Heussinger and Frey, 2007, Lieleg et al., 2007]).

La figure 2.10 montre bien les différences de module de cisaillement pour des gels d'actine enchevêtrés et réticulés.

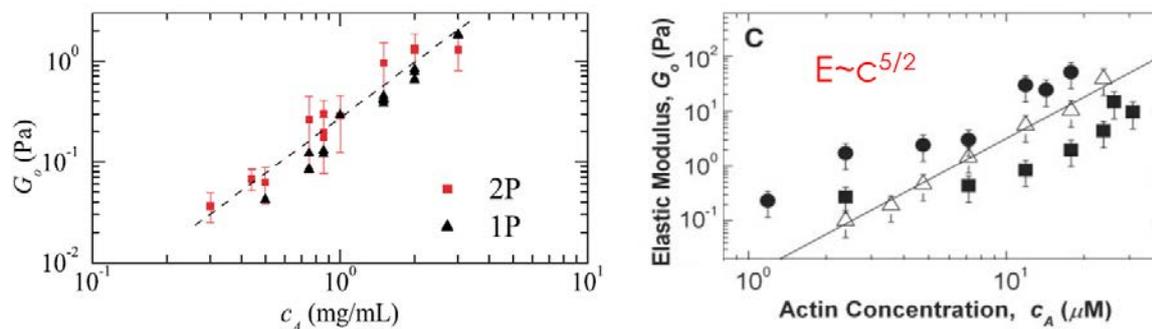


FIGURE 2.10 – Variation du module de cisaillement de gels enchevêtrés en fonction de la concentration en actine, d'après [Gardel et al., 2003] (à gauche), et pour des gels réticulés, d'après [Gardel et al., 2004] (à droite).

Un fort effet de rigidification sous contrainte, jusqu'à un facteur 100 sur le module pour un facteur 100 sur la contrainte, a été observé dans ce type de système quelle que soit la nature de l'agent réticulant [Xu et al., 2000, Gardel et al., 2003, Tharmann et al., 2007]. Cette forte non linéarité est l'une des caractéristiques des gels d'actine formés *in vitro* et est considérée comme une signature de l'origine entropique de l'élasticité.

On peut voir par exemple en figure 2.11 la variation du module différentiel en fonction de la déformation, pour des taux de réticulation R différents, avec $R = [\text{protéine de réticulation}] / [\text{actine}]$. Plus R augmente, plus les réseaux ont un module initial élevé. On observe une plus forte rigidification sous contrainte pour les réseaux faiblement réticulés (partie linéaire de la courbe). A forte contrainte, le module différentiel s'effondre, ce qui est probablement dû à une détérioration du réseau.

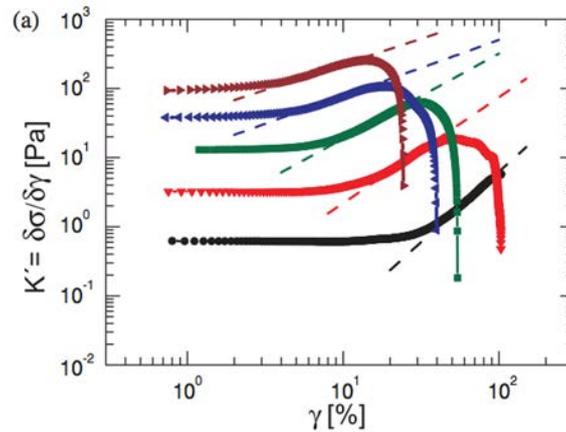


FIGURE 2.11 – Variation du module différentiel en fonction de la déformation, de noir à bordeaux $R=[0.0015, 0.0075, 0.038, 0.071, 0.14]$, d'après [Tharmann et al., 2007]

2.2.4 Travaux expérimentaux sur des gels d'actine branchés *in vitro*

Les expériences sur les gels en solutions vues précédemment donnent des résultats montrant la richesse de ces systèmes d'un point de vue physique, mais ces gels étant dilués et peu organisés (dans ce type de mesures, la concentration d'actine est limitée à quelques dizaines de μM ce qui est plus faible que les valeurs mesurées dans le lamellipode (de l'ordre de quelques centaines de μM [Koestler et al., 2009]).), ils ne reflètent pas la structure des gels dans le lamellipode, à savoir un réseau dense d'actine branché qui pousse à partir d'une surface. Nous avons vu en section 1.5 comment on est capable de recréer ces réseaux *in vitro*. Les gels ainsi reconstitués sont denses et organisés contrairement aux gels d'actine polymérisés en solution. Cette organisation est due à la présence de la protéine Arp2/3 qui nuclée des nouveaux filaments et forme des branches à 70° dans tout le réseau, aboutissant à une architecture dendritique.

Seulement deux montages expérimentaux en plus de celui développé dans notre équipe ont permis de s'intéresser à la mécanique de ces gels : l'un avec un AFM, l'autre avec des micropipettes. Dans chacun, on impose une force à un gel d'actine dense et branché polymérisant ou ayant polymérisé depuis une surface de quelques dizaines de micromètres carrés. Nous allons les décrire ci-dessous.

Étude mécanique des gels branchés par levier de verre

Le groupe de Cécile Sykes à l'Institut Curie a réalisé une expérience consistant à faire polymériser une comète d'actine à la surface d'une bille de polystyrène de $2 \mu\text{m}$ de diamètre recouverte de l'activateur N-WASP et attachée à une tige de flexibilité connue dans un milieu de protéines purifiées ([Marcy et al., 2004]). L'arrière de la comète est manipulé par une micropipette dont le déplacement permet d'exercer sur le gel des forces de traction ou de compression (voir figure

2.12). La déflexion de la tige permet d'accéder aux valeurs des forces.

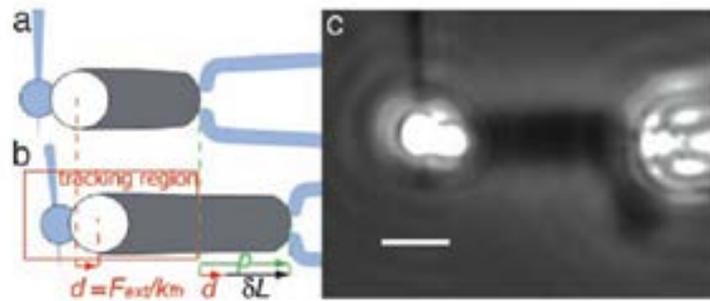


FIGURE 2.12 – Schéma et image de l'expérience de [Marcy et al., 2004]. (a) La comète d'actine (en gris) pousse depuis la bille (en blanc) maintenue par une tige flexible, et est manipulée à l'autre extrémité par une micropipette. (b) La micropipette est déplacée vers la droite de la figure, ce qui applique une force de traction sur la comète. (c) Image d'une comète maintenue par une micropipette (barre d'échelle, $5 \mu\text{m}$).

En poussant ou en tirant la micropipette, l'expérimentateur peut appliquer des forces de compression ou de traction de quelques nN. A force nulle, la vitesse vaut environ $2 \mu\text{m}/\text{min}$, soit $33 \text{ nm}/\text{s}$, ce qui est du même ordre de grandeur que la vitesse mesurée pour un objet propulsé de taille similaire ([Wiesner et al., 2003]).

Le module élastique de la comète d'actine peut être obtenu en tirant rapidement sur la comète : en effet, quand l'actine est tirée à des vitesses très grandes devant la vitesse de polymérisation, la comète subit une déformation élastique et on peut s'affranchir du changement de longueur induit par la polymérisation. Ils obtiennent une relation linéaire entre la force d'étirement et l'élongation, ce qui permet d'obtenir un module d'Young du gel (figure 2.13). Les valeurs obtenues sont de l'ordre de $3700 \text{ Pa} \pm 3000 \text{ Pa}$. On peut noter que sans protéines de réticulation (autres que Arp2/3) les gels polymérisés par ce système sont mille fois plus rigides que les gels enchevêtrés et dix à cent fois plus rigides que les gels polymérisés en volume.

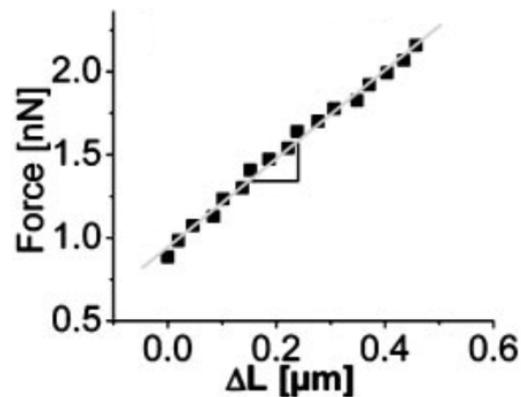


FIGURE 2.13 – Courbe force-longueur de la comète suite à une traction rapide. La pente correspond à la rigidité de la comète. D'après [Marcy et al., 2004].

Etude mécanique des gels branchés à partir d'un levier d'AFM

Le groupe de Daniel Fletcher à l'université de Berkeley a fait polymériser des gels d'actine branchés à partir d'une surface plane de cantilever d'AFM fonctionnalisée avec l'activateur d'Arp2/3, ce qui permet comme nous venons de le voir d'obtenir des gels similaires à ceux présents dans le lamellipode. Le gel s'allonge librement jusqu'à rencontrer la surface du bas. La déflexion du cantilever permet alors d'exercer une force sur le gel tout en mesurant la vitesse d'élongation. La force appliquée augmente avec la déflexion du cantilever et donc avec la croissance du gel, jusqu'à stopper la croissance. Nous reviendrons sur les résultats concernant la vitesse en section 2.3.

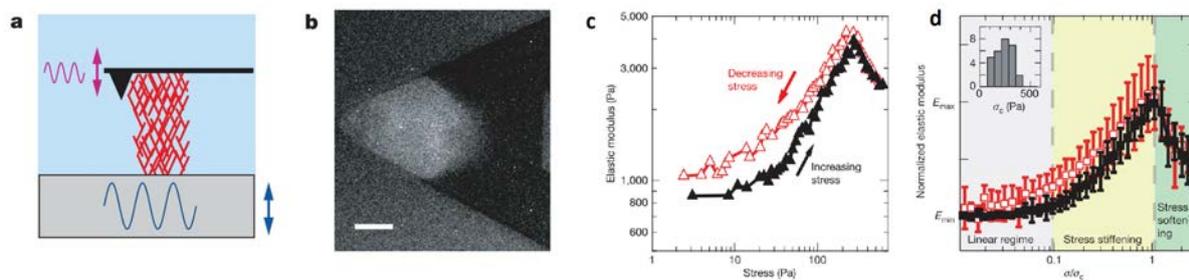


FIGURE 2.14 – Mesure d'AFM sur des gels d'actine branchés polymérisant à partir d'une surface. a : Schéma représentant la géométrie de mesure dans laquelle la surface est soumise à des oscillations sinusoïdales qui sont transmises par le réseau d'actine au cantilever. b : Image de fluorescence d'un réseau d'actine (barre d'échelle = $10\mu\text{m}$). c et d : Rigidification sous contrainte et amollissement sous contrainte réversible. D'après [Chaudhuri et al., 2007]

[Chaudhuri et al., 2007] ont mesuré le module élastique en appliquant une brève oscillation de la surface, qui provoque une oscillation en force, et en mesurant la déformation du cantilever en phase et hors phase. Ils calculent ensuite le module élastique comme la partie réelle du rapport de la contrainte sur la déformation et le module de perte (ou module de dissipation, qui caractérise le comportement visqueux) comme sa partie imaginaire. En connaissant la distance entre le levier et le substrat grâce à un second levier d'AFM, ils contrôlent la pré-contrainte.

Comme pour les expériences de rhéologie, les auteurs se sont intéressés au comportement visco-élastique du gel (entre 0.1 et 10 Hz) et son comportement non linéaire (en appliquant une pré-contrainte sur le gel). Ces expériences étant complexes à réaliser, seuls douze gels ont été polymérisés, ce qui explique de larges écarts types :

- Le module d'Young mesuré à faible pré-contrainte est de 985 ± 655 Pa, il varie faiblement en fréquence ($E \sim f^{0.13}$). Cette valeur est en accord avec celle estimée par [Marcy et al., 2004] de 3.7 kPa. Il est tout à fait remarquable que sans pré-contrainte, la valeur du module d'Young de ces gels soit du même ordre que la rigidité de certains types cellulaires.
- Le module de perte E'' est bien inférieur au module élastique sur la gamme des basses fréquences.

- Un comportement non linéaire a été observé : après un court régime linéaire le module augmente d'un facteur 3.5 quand la précontrainte augmente elle d'un facteur 10, puis suit une phase de décroissance : on assiste à un assouplissement. Le plus surprenant est que lors de la décharge, l'hystérésis est très faible, ce qui écarte tout dommage fait au matériau (rupture de filament, glissement du gel) comme cause de l'amollissement.

La rigidification sous contrainte est observée pour des réseaux réticulés d'actine polymérisée en solution même si ici, l'amplitude de cet effet non linéaire est plus faible ([Gardel et al., 2004, Storm et al., 2005, Gardel et al., 2006]). Cette rigidification est expliquée par une élasticité entropique. La phase d'amollissement réversible n'avait par contre jamais été rapportée. Les auteurs l'attribuent au flambage microscopique des filaments. L'idée est qu'après une phase de déformation affine, les filaments supportant la plus grande compression flambent : le nombre de filaments qui s'opposent à la déformation du matériau étant plus petit, le module d'Young décroît. Le flambage étant réversible, les filaments vont de nouveau présenter une rigidité finie après la décompression d'où la faible hystérésis. On peut également interpréter cette transition comme le passage d'une élasticité d'élongation (entropique ou enthalpique) à une élasticité de flexion enthalpique lorsque la contrainte augmente. L'hystérésis est due à la croissance du réseau pendant l'expérience.

Utilisation de billes superparamagnétiques

Les deux expériences précédentes ont la limitation de ne fournir que peu de données car sont très difficiles à réaliser. Elles ne permettent donc pas de faire des mesures systématiques à haut débit, ce qui est un problème en biologie à cause de la dispersion des données.

Pour dépasser cette limitation, l'équipe de biophysique du PMMH a développé une nouvelle méthode de mesure à haut débit sur des gels d'actine branchés poussant à partir d'une surface [Pujol et al., 2012].

La technique repose sur les interactions dipolaires qui se développent entre des colloïdes superparamagnétiques placés dans un champ magnétique. L'idée est d'utiliser cette force pour déformer de façon contrôlée des gels d'actine assemblés autour de ces colloïdes. Le superparamagnétisme est détaillé en section 2.1.2.

Principe de l'expérience Des colloïdes sphériques superparamagnétiques de $4.4\mu\text{m}$ de diamètre sont fonctionnalisés avec le domaine VCA pour que des réseaux d'actine s'assemblent depuis leur surface (figure 2.15). En présence d'un champ magnétique, les colloïdes s'attirent par la force d'interaction dipolaire. Lorsqu'un gel d'actine se trouve entre deux billes, la force magnétique attractive entre les colloïdes est compensée par la force élastique qui résiste à la déformation du gel : $\vec{F}_{mag} + \vec{F}_{el} = \vec{0}$. La force élastique est liée à la contrainte mécanique σ

dans le matériau par $F_{el} = \sigma S$ et $\sigma = E\epsilon$ où E est le module de Young du matériau, S la surface de contact entre le gel d'actine et la particule colloïdale qui lui fait face, et ϵ la déformation du gel. Comme le contact se fait entre deux sphères, la surface de contact varie avec l'indentation δ , et il est nécessaire d'utiliser le modèle de Hertz pour la déterminer ($S \propto \delta R$, avec $\frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}$, R_1 et R_2 étant les rayons des deux sphères). On peut alors extraire E de ce type de mesures.

Cette technique bénéficiant de l'auto-organisation en chaînes des colloïdes sous champ magnétique, elle permet de disposer d'un dispositif de mesure simplement constitué par une paire de colloïdes et ainsi de pouvoir suivre en parallèle un grand nombre de gels (figure 2.15). C'est ce qui la distingue radicalement des autres techniques type AFM ou micropipette dans lesquelles la difficulté des expériences limite le nombre de gels testés. Des études systématiques ont permis d'étudier l'évolution de l'élasticité des gels en fonction des concentrations en Arp2/3 et en gelsoline, des protéines utilisées pour fabriquer le réseau.

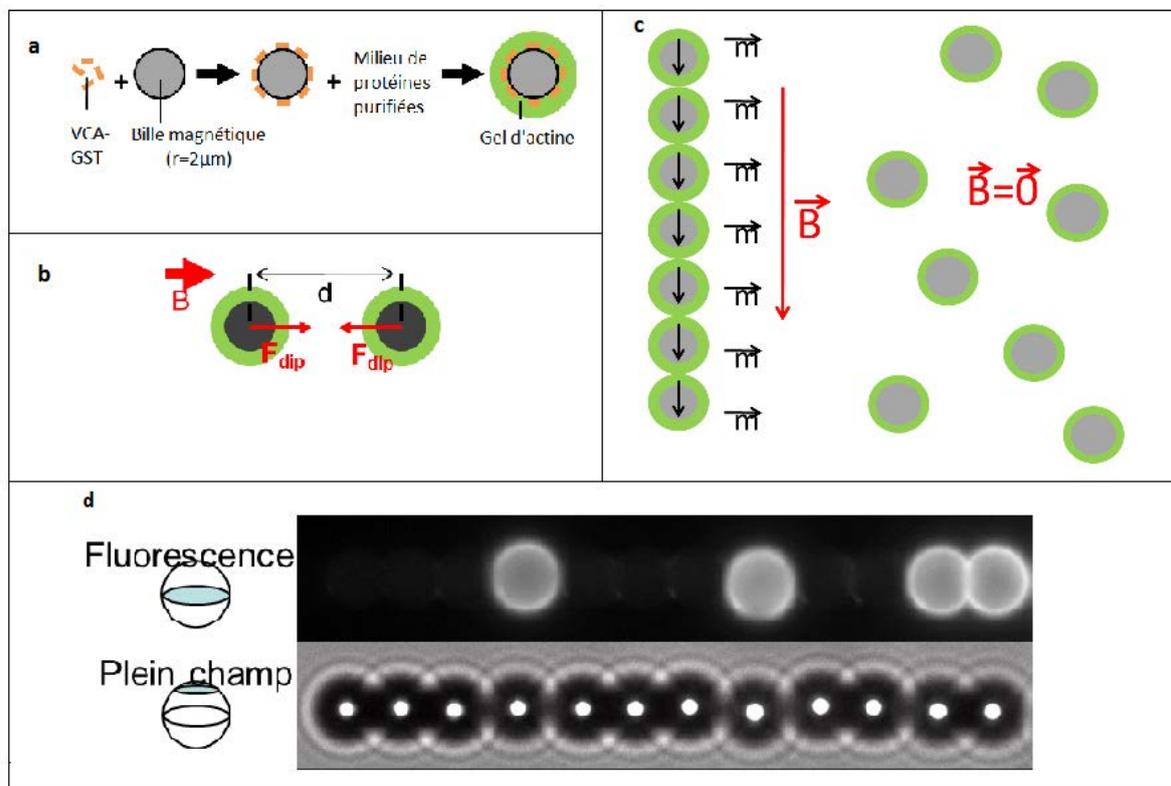


FIGURE 2.15 – a) Reconstitution de réseaux d'actine branchés à partir de la surface de colloïdes sphériques. b) Interaction dipôle-dipôle. c) Auto organisation de colloïdes superparamagnétiques sous champ magnétique due à l'interaction dipolaire sous forme de chaîne. d) Image typique d'une chaîne de billes. En bas, image en fond clair focalisée sur le haut des billes. En haut : image en fluorescence de la même chaîne focalisée dans le plan médian des billes.

Lien architecture-élasticité : La figure 2.16 montre la dépendance du module élastique en fonction du branchement (en rouge). On observe un effet de rigidification important pour des concentrations comprises entre 10 et 100 nM qui induisent une multiplication par 10 du module.

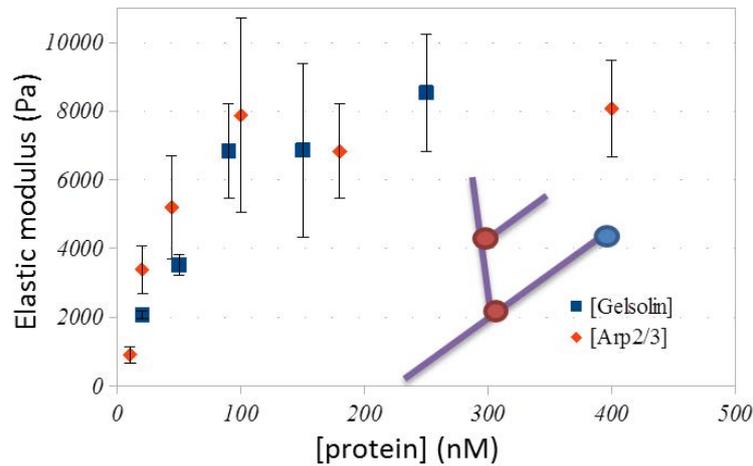


FIGURE 2.16 – Evolution du module d’Young des gels d’actine branchés en fonction de la concentration en Arp2/3 ou Gelsoline

Au-delà, le module sature. Il a aussi été montré que la densité en actine varie peu, ce qui fait que l’évolution du module élastique n’est pas attribuable à une variation de la densité en actine mais plutôt à une variation de l’architecture du réseau. Le plateau observé au-delà des 100 nM d’Arp2/3 peut être dû à une saturation biochimique (i.e. tous les sites VCA sont occupés) ou à une saturation mécanique (la distance entre branches diminue mais cela n’a pas d’influence sur la réponse mécanique).

Les résultats de la dépendance en gelsoline apparaissent en bleu sur la figure 2.16. On voit que comme pour Arp2/3, le module d’Young du réseau augmente avec la concentration en gelsoline jusqu’à un plateau, tandis que la densité d’actine varie peu. La gelsoline étant une protéine de coiffe, elle se fixe au bout des filaments en croissance pour bloquer leur polymérisation, ce qui donne des filaments plus courts. Cela a pour effet de diminuer l’enchevêtrement (on pourrait alors s’attendre à un amollissement des gels) et d’augmenter le nombre de ramifications par branches puisque les filaments restent plus longtemps à proximité de la surface d’activation, et donc de rigidifier le réseau. C’est cet effet qui a sans doute été observé ici car la concentration en Arp2/3 est élevée.

2.3 Génération de forces

Différents modèles tâchent d’expliquer les forces générées par la polymérisation des réseaux d’actine dans le lamellipode ou les filipodes, mais peu d’expériences permettent aujourd’hui de les valider. Cette section sera consacrée à la présentation des modèles qui ont été proposés pour décrire les forces générées au sein du lamellipode, puis nous verrons les expériences qui tâchent d’en rendre compte.

2.3.1 Modèle du Brownian ratchet

On s'intéresse ici à la polymérisation d'un filament unique qui pousse contre une paroi soumise à des fluctuations par l'agitation thermique. George Oster et son groupe [Peskin et al., 1993] furent les premiers à proposer un mécanisme de génération de force par polymérisation de filaments. Comme son principe repose sur les fluctuations thermiques de la charge à déplacer, il a été appelé Brownian ratchet, ou cliquet Brownien, en référence à la machine imaginée par Feynman et al. 1963, qui permet, à partir des fluctuations thermiques d'un gaz, de produire un mouvement dirigé à condition qu'il existe une asymétrie énergétique dans le système. Dans cette machine imaginaire c'est la roue à cliquet qui crée cette asymétrie. Dans notre cas l'asymétrie provient du potentiel chimique qui donne un sens préférentiel à la réaction de polymérisation.

Le modèle de Peskin et al. se place dans la situation d'un filament rigide et incompressible fixement ancré à une extrémité et polymérisant à son autre extrémité contre une charge soumise à l'agitation thermique qui la fait fluctuer horizontalement. A chaque fois que l'excursion de la charge vers la droite est supérieure à δ , un monomère peut s'insérer au bout d'un filament, d'où l'asymétrie du mécanisme (voir figure 2.18.A).

On considère la charge comme un objet de coefficient de diffusion D . Dans un régime où la charge exerce une force négligeable sur le filament, la réaction est seulement limitée par la diffusion de cet objet et le cliquet est dit parfait. Le temps pour la charge de s'écarter d'un pas δ est donné par l'expression de diffusion à 1D :

$$t_\delta = \left(\frac{\delta^2}{2D} \right) \quad (2.11)$$

Dès que la charge s'est écartée de δ , un monomère peut s'insérer. La vitesse d'élongation est donc :

$$v = \left(\frac{\delta}{t_\delta} \right) = \left(\frac{2D}{\delta} \right) \quad (2.12)$$

En pratique, les objets pouvant exercer une force sur un filament d'actine ont un coefficient de diffusion de l'ordre du $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Cela donnerait v de l'ordre de 1 mm/s, ce qui est très grand devant la vitesse de polymérisation en solution (typiquement $1\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Ce régime n'est jamais atteint, et en pratique, la force générée est limitée par la quantité d'énergie libre libérée par la réaction de polymérisation.

D'après [Peskin et al., 1993] la vitesse de polymérisation devient :

$$v = \delta [Ck_{on} \times \exp\left(\frac{-F\delta}{kT}\right) - k_{off}] \quad (2.13)$$

On peut alors tracer le profil de vitesse qui présente une allure convexe (voir figure 2.17), sur lequel on peut voir la *stalling* force de l'ordre de 5 pN (*i.e* force nécessaire pour stopper la polymérisation).

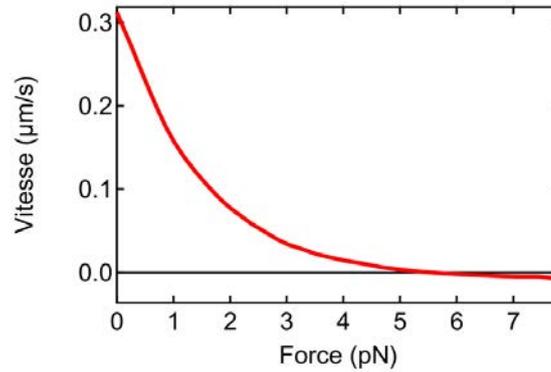


FIGURE 2.17 – Profil de vitesse du modèle du Brownian Ratchet, avec $C=10\mu\text{M}$, $k_{on}=11.3\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{off}=1.6\text{s}^{-1}$.

2.3.2 Brownian ratchet élastique

Le modèle du Brownian ratchet présenté ci-dessus a pour principal inconvénient de ne pas tenir compte des fluctuations à l'échelle du filament, qui peuvent être aussi grandes que celles de la charge.

Mogilner and Oster ([Mogilner and Oster, 1996]) examinent le cas dans lequel le filament, toujours fixement ancré à une extrémité, possède un module élastique fini qui le rend sensible aux fluctuations thermiques alors que la charge est maintenant considérée comme stationnaire. Seul le mode de fluctuation en flexion est considéré. Lorsque le filament fléchit suffisamment pour libérer un espace de taille δ entre lui et la paroi, un monomère peut s'insérer. Le filament relaxe alors l'énergie de courbure excédentaire acquise avec cette nouvelle sous-unité en exerçant sur la charge une force assimilable à celle d'un ressort de constante

$$k = \left(\frac{4L_p k_B T}{L^3 \sin^2 \theta} \right) \quad (2.14)$$

où L est la longueur du filament et θ l'angle qu'il fait avec l'horizontale à son point d'ancrage. D'après [Mogilner and Oster, 1996] la vitesse d'élongation s'écrit alors ;

$$v = \delta \cos \theta [C k_{on} p(\theta, f) - k_{off}] \quad (2.15)$$

avec $p(\theta, f)$ la probabilité qu'il y ait un espace de $\delta \cos(\theta)$ entre le bout du filament et la charge, à une force f . Cette probabilité dépend aussi de la flexibilité du filament à travers les paramètres L et L_p . On peut tracer le profil de vitesse pour le modèle du Brownian Ratchet élastique (voir figure 2.19), avec un angle optimum $\theta=48^\circ$. Le profil est aussi convexe, avec une zone de vitesse indépendante de la charge à faibles forces.

2.3.3 Passage à N filaments

Les modèles précédents ne tenaient compte que d'un seul filament. Dans les modèles de Brownian ratchet, pour repousser la charge d'une distance δ , il faut fournir le travail $F\delta$. S'il y a N filaments, le travail moyen à fournir par filament sera alors $\frac{F\delta}{N}$. La vitesse devient alors :

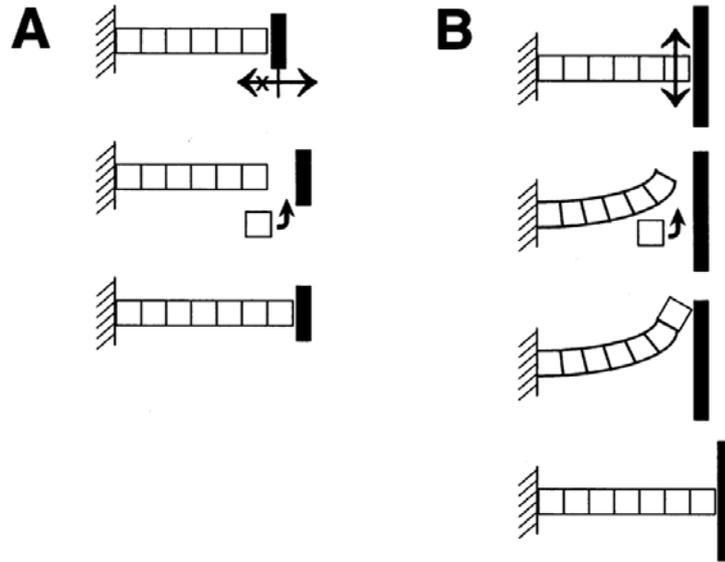


FIGURE 2.18 – Les modèles de Brownian ratchet comme moteur de la polymérisation, d’après [Theriot, 2000]. A) Le modèle du Brownian ratchet. B) Le modèle du Brownian ratchet élastique.

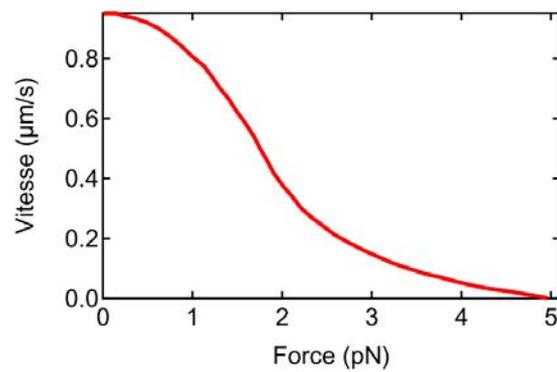


FIGURE 2.19 – Profil de vitesse du modèle du Brownian Ratchet élastique, avec $C=45\mu\text{M}$, $k_{on}=11\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{off}=1\text{s}^{-1}$. D’après [Démoulin, 2012].

$$v = \delta [Ck_{on} \times \exp\left(\frac{-F\delta}{NkT}\right) - k_{off}] \quad (2.16)$$

et la *stall force* est elle aussi multipliée par N .

Cependant, dans les systèmes biologiques, les filaments ne sont pas isolés et agissent de concert. [Schaus and Borisy, 2008] identifient trois mécanismes selon lesquels les filaments se partagent la charge :

- Dans le lamellipode, les filaments sont orientés dans différentes directions, ce qui donne une distribution des distances charge-filaments. Ceci permet de réduire la taille effective nécessaire à l’ajout d’un monomère.
- Une membrane flexible augmente le nombre de filaments en contact avec elle
- Les filaments très flexibles peuvent se partager le travail uniformément.

Pour rendre compte de ces phénomènes, des simulations numériques ont été effectuées.

2.3.4 Modèle auto catalytique - Simulations numériques

Les modèles analytiques présentés ci-dessus ne tiennent pas compte de la variabilité des filaments ni de leurs interactions. Les simulations numériques permettent d'intégrer ces deux derniers points dans une certaine mesure. La structure simulée est semblable à celle que l'on retrouve au sein du lamellipode, c'est à dire une structure dendritique où les nouveaux filaments sont nucléés par branchement grâce à une protéine de nucléation comme Arp2/3 par exemple.

Carlsson [Carlsson and Carlsson, 2001], par des simulations stochastiques de type Monte-Carlo, peut recréer un réseau dont la structure est très proche du lamellipode et qui est capable de propulser une barrière à vitesse comparable à celles observées *in vitro*. Des travaux plus poussés [Carlsson, 2003] qui distinguent les lois de vitesse pour chaque filament donnent sensiblement les mêmes résultats. Un effet surprenant apparaît. Le fait que Arp2/3 soit souvent situé très près de la membrane conduit à l'hypothèse que le taux de branchement est proportionnel au nombre de filaments en contact avec la barrière (régime autocatalytique). L'augmentation de la contrainte exercée sur le réseau augmente le nombre de filaments en contact avec la surface et donc le taux de branchement. La vitesse d'élongation est donc peu affectée par la contrainte puisque la force par filament est sensiblement constante. Cet effet pourrait expliquer la forme concave du profil de force observé par [Parekh et al., 2005] (figure 2.22) ou [Prass et al., 2006].

2.3.5 Travaux préalables

Expériences sur filaments

On a vu que les formines permettent d'assembler les filaments d'actine en câbles rigides. [Kovar and Pollard, 2004] caractérisent l'effet de deux formines sur l'assemblage de l'actine par microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Les deux protéines nucléent de nouveaux filaments d'actine ou capturent le bout barbé de filaments pré-formés qui poussent par l'insertion de sous-unités entre la formine immobilisée et le bout barbé du filament. Les deux types de formines restent attachées aux filaments pour plus d'une seconde. L'élongation d'un filament entre une formine immobilisée et un second point d'ancrage flambe des segments de filaments aussi petits que $0.7 \mu\text{m}$, démontrant que la polymérisation d'un filament unique produit des forces de l'ordre du piconewton, proche du maximum théorique.

[Footer et al., 2007] étudient par piège optique les forces générées par l'élongation de quelques filaments d'actine en parallèle contre une barrière rigide, mimant la géométrie de la protrusion du lamellipode. Ils observent que la croissance d'environ huit filaments d'actine peut être stoppée par des forces faibles de l'ordre de 1 pN, ce qui est en accord avec la charge théorique nécessaire pour stopper l'élongation d'un filament unique dans les mêmes conditions. En effet, les larges fluctuations de longueurs pendant la phase de blocage (stall phase) indiquent que seulement le filament le plus long de tous est en contact avec la barrière à un moment donné. Ces résultats

suggèrent que la génération de force par des filaments en fagots est limitée par l'instabilité dynamique des filaments uniques, et ainsi les cellules doivent utiliser des ABP pour supprimer cette instabilité et générer des forces substantielles par l'élongation de fagots parallèles de filaments d'actine.

[Brangbour et al., 2011] ont développé une méthode dans laquelle des filaments d'actine poussent depuis la surface de billes superparamagnétiques qui sont alignées par un champ magnétique contrôlé. La distance entre les billes augmente avec le temps quand la force est maintenue constante. Ils observent que la croissance des filaments d'actine n'est pas affecté par la charge, en contraste avec le modèle du Brownian ratchet. A la place, leurs résultats suggèrent que la surface opposant les filaments en croissance impose des restrictions aux fluctuations d'orientation d'un filament, induisant une force répulsive. Le confinement des filaments augmente au cours de leur croissance, ce qui en retour augmente la force répulsive développée par leurs fluctuations. Ce mécanisme entropique peut opérer pendant des processus de motilité quand les réseaux d'actine sont faiblement organisés.

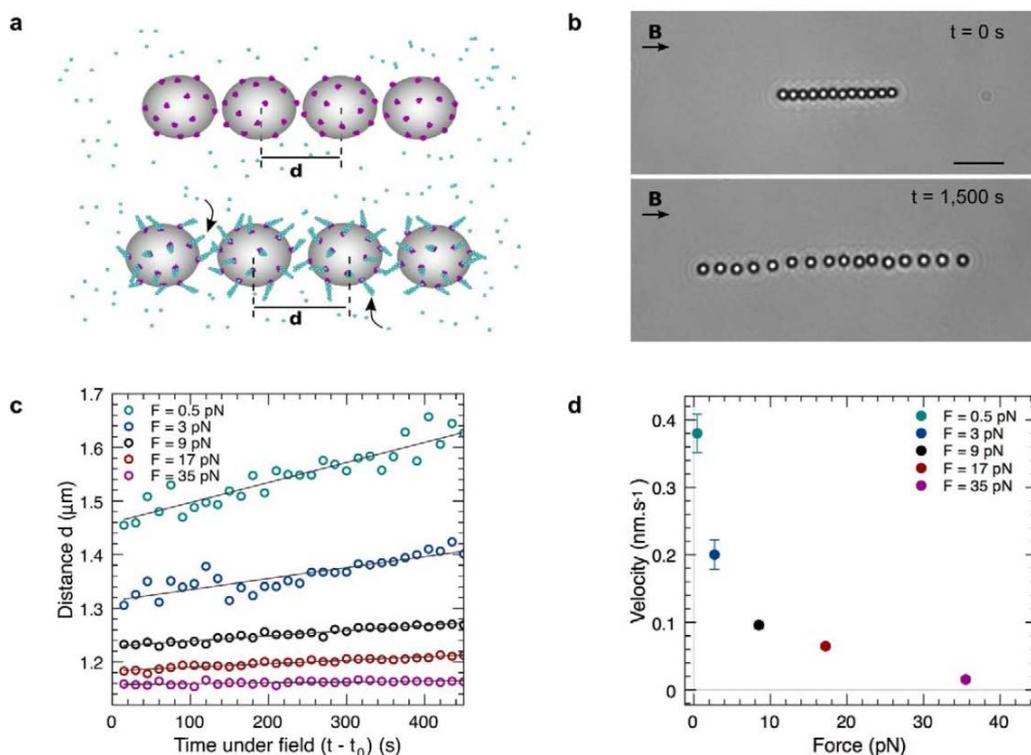


FIGURE 2.20 – Schéma expérimental et mesures force vitesse. (a) Schéma de l'expérience : la polymérisation de l'actine est initiée à la surface de la bille par la gelsoline, et écarte les billes les unes des autres. (b) Image d'une chaîne de colloïdes alignés dans un champ magnétique de 5 mT, à deux temps différents. La polymérisation d'actine sépare les colloïdes. Les filaments d'actine ne sont pas suffisamment denses pour être vus. Barre d'échelle, 5 μm . (c) Evolution de la distance centre à centre d en fonction du temps pour différentes forces. La distance augmente linéairement avec le temps, permettant une mesure directe des vitesses relatives des billes. (d) Profil force vitesse. D'après [Brangbour et al., 2011]

Expériences de motilité

Nous avons vu en section 1.5 que pour faire varier la force exercée sur un objet en mouvement, une des solutions était de faire varier la viscosité du milieu. [McGrath et al., 2003] étudient la relation force-vitesse de la motilité de la bactérie *Listeria monocytogene* dans un extrait cellulaire (figure 2.21.A). Ils obtiennent un profil convexe. Au contraire, la polymérisation d'une comète d'actine à la surface d'une bille dans un milieu de protéines purifiées donne un profil force-vitesse concave ([Wiesner et al., 2003], figure 2.21.B).

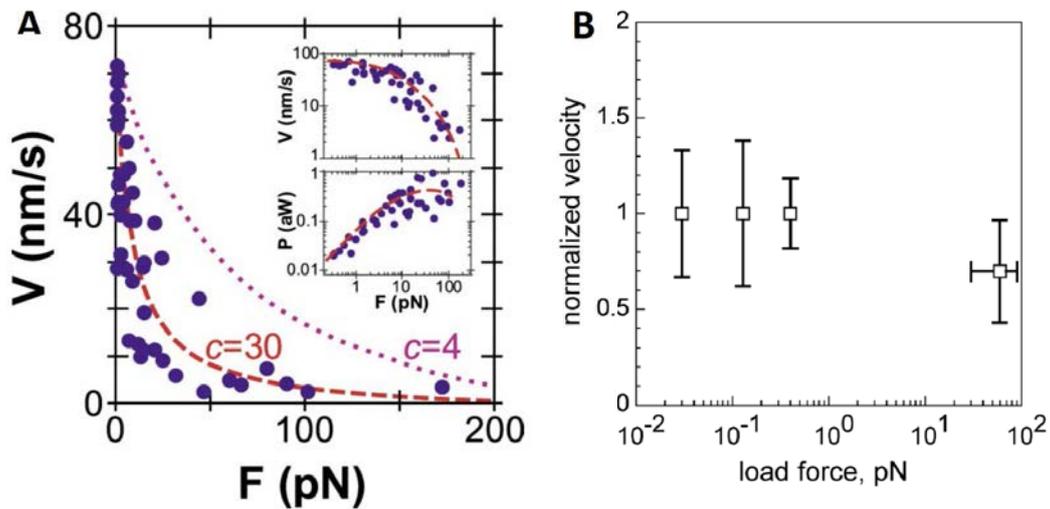


FIGURE 2.21 – Gauche : Profil force-vitesse de la *Listeria*, d'après [McGrath et al., 2003]. Droite : Profil force-vitesse de la motilité d'une bille sur laquelle pousse une comète d'actine en milieu de protéines purifiées, d'après [Wiesner et al., 2003].

Expériences sur des réseaux branchés poussant sur un cantilever d'AFM

Le dispositif décrit plus haut (section 2.2.4) permet d'étudier la variation de la vitesse de croissance d'un gel d'actine branché en fonction de la force appliquée par le cantilever. Le gel pousse sur une surface d'environ $400 \mu\text{m}^2$, et lors de sa croissance, il défléchit le cantilever ce qui augmente la force. Les forces exercées sont de l'ordre de 100 nN, ce qui équivaut à une contrainte de 250 Pa. Trois phases sont systématiquement observées lors de la croissance : (a) une phase transitoire considérée comme non pertinente pendant laquelle la vitesse augmente avec la force ; (b) une phase linéaire où la vitesse est indépendante de la force ; (c) une phase de ralentissement jusqu'à l'arrêt (voir figure 2.22). Les expériences sur différents gels sont difficilement comparables entre elles car la densité de protéines nucléatrices greffées sur le cantilever et la taille du gel ne sont pas maîtrisées. On observe un profil force-vitesse concave, plutôt en accord avec un modèle auto-catalytique.

Également, le groupe de Daniel A. Fletcher observe une dépendance de l'histoire des gels sur leur vitesse de croissance. En particulier, en imposant une contrainte pendant un certain temps sur un gel en croissance, il est possible de stimuler la vitesse de croissance de ce gel, *i.e.* la vitesse pour une contrainte donnée sera plus importante que la vitesse à cette même contrainte avant la

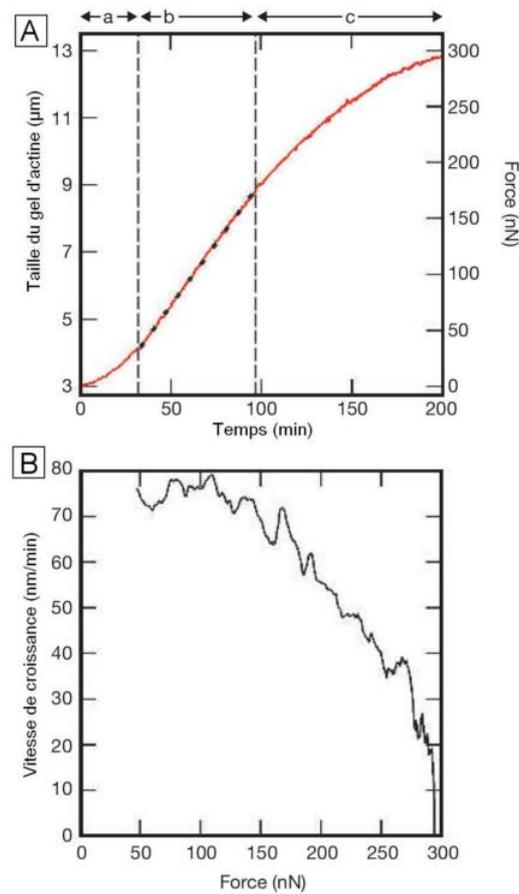


FIGURE 2.22 – Profil vitesse-force réalisé sur un même gel d'actine. A : évolution temporelle de la longueur et de la force. B : évolution de la vitesse (dérivée de A) en fonction de la force. D'après [Parekh et al., 2005]

compression ([Parekh et al., 2005], figure 2.23).

Expérience sur des réseaux branchés par levier de verre

La technique en micropipette vue en section 2.2.4 permet elle aussi d'étudier les variations de vitesse de polymérisation en fonction de la force appliquée sur le système (figure 2.24). Cette technique permet de pousser sur la comète, ou de la tirer en exerçant des forces négatives.

On voit que dans ce cas, la courbe est convexe, tandis que dans les expériences du groupe de Daniel A. Fletcher elle est concave. Il faut noter que les systèmes biochimiques utilisés dans ces deux techniques sont différents, puisque les mesures en AFM ont été faites sur des extraits d'oeuf de *Xenopus*, tandis que les mesures en micropipette ont été faites avec un mélange de protéines purifiées. Dans les deux cas, la *stalling force* n'est jamais atteinte. On peut aussi noter que ces résultats sont à l'opposé de ceux présentés en figure 2.21 sur la motilité de la *Listeria* en extraits cellulaires et de billes propulsées par des comètes d'actine poussant en milieu de protéines purifiées.

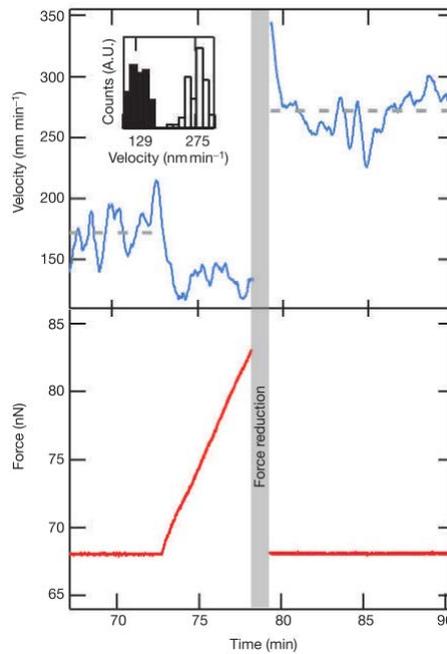


FIGURE 2.23 – L’histoire de la charge qu’a subit le gel au cours de son histoire affecte sa vitesse de polymérisation. On voit ici que le fait d’augmenter la charge sur le gel pendant quelques temps permet de stimuler sa croissance par rapport à son état avant compression. D’après [Parekh et al., 2005].

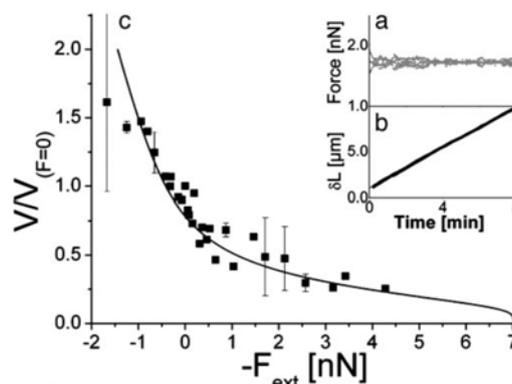


FIGURE 2.24 – Profil vitesse-force. D’après [Marcy et al., 2004]

Travaux préalables sur cellules entières

[Prass et al., 2006] ont réalisé des mesures directes de la force de protrusion du lamellipode d’une cellule en migration. Ils placent un cantilever d’AFM sur le chemin d’un kératocyte en migration, et la déflexion du cantilever sur une période d’environ 10 secondes donne une mesure directe de la force exercée par le lamellipode (figure 2.25). Les valeurs des *stalling* forces obtenues correspondent à la force générée par environ 100 filaments en polymérisation par micromètre, chacun marchant selon le modèle du Brownian Ratchet et générant une force de plusieurs piconewtons. Cependant, les courbes force-vitesse obtenues, dans lesquelles la vitesse décroît drastiquement en réponse à une très faible charge, ne sont pas très sensibles à de très faibles forces, et s’effondrent rapidement à de fortes charges, ce qui n’est pas en adéquation avec les mo-

dèles théoriques de génération de force comme le Brownian ratchet, mais qui correspond plutôt à un modèle auto-catalytique. Ces courbes indiquent que la génération de forces protrusives est un processus complexe en plusieurs étapes, impliquant l'actine et la dynamique d'adhésion.

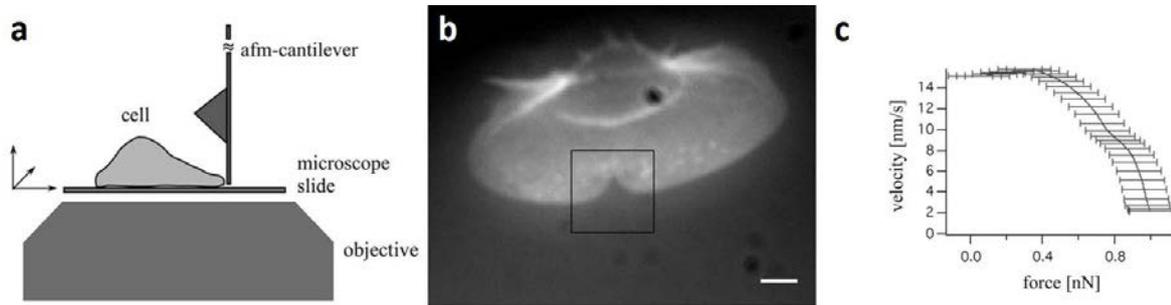


FIGURE 2.25 – Génération de force par un lamellipode. a : schéma de l'expérience. b : Image de l'indentation du cantilever sur le lamellipode (barre d'échelle, 5 μm). c : Courbe force-vitesse réalisée à partir des mesures effectuées sur un lamellipode en migration. D'après [Prass et al., 2006]

Conclusion : Nous avons vu dans ce chapitre différentes techniques de mesures de mécanique et de génération de forces, sur des cellules entières et sur des gels d'actine branchés reconstitués *in vitro*. La relation force-vitesse n'est pas cohérente entre les différentes expériences réalisées. En effet, que ce soit en imposant une force mécanique ou en changeant la viscosité du milieu, sur des gels reconstitués dans des extraits cellulaires ou dans des milieux de protéines purifiées, ou même sur des cellules, les résultats donnent des profils convexes ou concaves. Les expériences avec les techniques d'AFM et de fibres de verre sont difficiles à réaliser, et peu de mesures ont été faites. L'expérience avec des billes superparamagnétiques permet de dépasser ces limites dans le cas de la mécanique et de faire des mesures systématiques à haut débit. Cependant la géométrie sphérique du système est à l'origine de plusieurs limitations. Le chapitre suivant proposera une nouvelle technique de mesure permettant de les surmonter.

Chapitre 3

Aspects expérimentaux

Sommaire

3.1	Vers une nouvelle méthode de mesure	59
3.2	Comment fabriquer des microparticules magnétiques de géométrie contrôlée?	61
3.2.1	Méthodes de fabrication existantes	61
3.2.2	Limitations	61
3.3	Cylindres	62
3.3.1	Microfabrication des cylindres superparamagnétiques	62
3.3.2	Mesure de la susceptibilité magnétique des cylindres	68
3.3.3	Calcul de la force d'interaction entre deux cylindres	71
3.4	Reconstitution de gels d'actine <i>in vitro</i> à la surface de colloïdes superparamagnétiques	76
3.4.1	Méthodes de fonctionnalisation des cylindres	76
3.4.2	Mélange de croissance	77
3.4.3	Préparation de l'échantillon	77
3.5	Montage expérimental	78
3.6	Traitement d'images	80
3.6.1	Corrélation subpixels d'images	80
3.6.2	Détermination des contours des cylindres	83

3.1 Vers une nouvelle méthode de mesure

Les travaux présentés dans le chapitre précédent concernant d'une part la caractérisation mécanique des gels d'actine denses et branchés, et d'autre part l'étude de la polymérisation de gels sous contrainte, laissent de nombreuses questions en suspens.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de [Pujol et al., 2012] qui utilisent l'auto organisation de colloïdes superparamagnétiques sous un champ magnétique pour étudier les propriétés des gels d'actine denses et branchés. L'avantage principal de cette méthode est de pouvoir faire des mesures systématiques en fonction des concentrations des protéines et des sollicitations

mécaniques. Cependant, elle connaît quelques limitations.

Son inconvénient est la géométrie sphérique des colloïdes qui limite le champ d’application de cette technique. La croissance se déroulant depuis la surface des colloïdes, elle est contrainte par le gel déjà existant ce qui limite les comparaisons avec la situation *in vivo* et peut induire des effets couplés avec la non linéarité du matériau. Également, elle ne permet pas d’étudier proprement les effets de rigidification et d’amollissement sous contrainte. En effet la géométrie sphérique impose dans le contact une déformation plus importante au centre que sur le pourtour. Il n’est ainsi pas possible d’appliquer une contrainte contrôlée et de mesurer le module élastique non linéaire. Enfin, il n’est pas non plus possible de maintenir une comète d’actine entre deux billes, ce qui ne permet pas de faire des mesures de force-vitesse (voir figure 3.1).

Dans cette thèse, pour dépasser ces limitations, nous avons développé de nouveaux objets magnétiques de taille micrométrique avec des faces planes. Ils permettent de s’affranchir de la géométrie sphérique, et ainsi d’avoir un gel non contraint, une aire de contact constante au cours de la compression, une contrainte appliquée homogène dans tout le gel, et de pouvoir maintenir une comète grâce à l’orientation des cylindres. L’objectif est d’obtenir directement des courbes contraintes-déformation traduisant les propriétés non linéaires du matériau ainsi que des courbes force-vitesse au cours de la polymérisation permettant de remonter aux mécanismes de génération de forces.

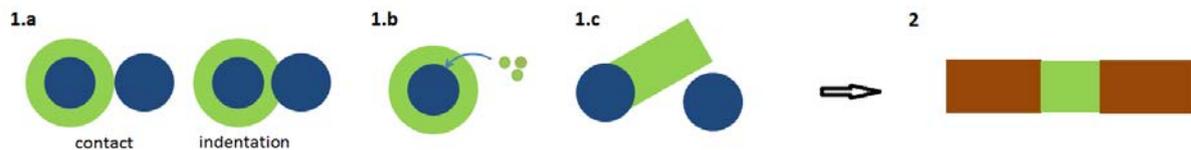


FIGURE 3.1 – Principe de la mesure. À gauche, les gels poussant sur une surface sphérique sont contraints (1.b), le contact n’est pas homogène (1.a), et il n’est pas possible de maintenir une comète (1.c). À droite, les gels poussent sur des faces planes, permettant de surmonter les difficultés du cas sphérique (2).

Une façon d’accéder à une description plus précise du mécanisme à l’oeuvre dans la génération de forces par la polymérisation de l’actine dans la migration cellulaire est d’obtenir des courbes forces-vitesse. Précédemment, les courbes forces-vitesse générées par des réseaux denses de filaments branchés en croissance ([Marcy et al., 2004, Parekh et al., 2005]) étaient difficiles à mettre en oeuvre et ont fourni des résultats différents. Les cylindres magnétiques nous permettent de réaliser des mesures systématiques en fonction des concentrations de protéines, des partenaires présents, et des forces appliquées.

Ce chapitre est consacré au développement de la nouvelle technique de mesure des propriétés des gels d’actine branchés reconstitués *in vitro* sur des objets plats. Nous verrons comment fabriquer de tels objets superparamagnétiques, comment faire pousser des gels à leur surface,

puis le montage expérimental permettant de réaliser des mesures de mécanique et de génération de forces des gels.

3.2 Comment fabriquer des microparticules magnétiques de géométrie contrôlée ?

L'objectif est de fabriquer des particules superparamagnétiques de tailles micrométriques (quelques micromètres), de géométrie contrôlée, de contenu magnétique important afin d'obtenir des forces de quelques nanonewtons, en grand nombre, faciles à récolter et à manipuler, et biocompatibles. Nous allons passer quelques exemples en revue qui illustrent les méthodes de fabrications actuelles et leurs limitations, et les raisons pour lesquelles nous avons développé une nouvelle méthode.

3.2.1 Méthodes de fabrication existantes

L'idée générale jusqu'ici a été de réticuler (à la chaleur, aux ultra-violets, ...) des objets de forme contrôlée et de les "fourrer" avec des nanoparticules. Pour fabriquer les formes, les techniques utilisées sont basées soit sur la lithographie, soit sur le "stop flow". Pour incorporer des nanoparticules, on peut soit les mélanger avec la matrice avant réticulation, soit les synthétiser in situ.

Plusieurs techniques basées sur la lithographie ont été mises en oeuvre ([Nunes et al., 2010, Suter et al., 2011, Suh et al., 2012]). Par exemple, [Nunes et al., 2010] rapporte la fabrication de colloïdes magnétiques en photopolymérisant sous champ magnétique des matrices de polymères chargées en particules de Fe_3O_4 (voir figure 3.2.A). Un exemple de fabrication in situ est celui du groupe de Patrick Doyle aux États-Unis : Avec une technique de "stop-flow lithography" ([Dendukuri et al., 2007]), ils synthétisent des particules de polymères comportant des groupes carboxyles capables de capturer des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} qui sont ensuite coprécipités pour former des nanoparticules magnétiques incorporées dans des matrices de polymères. Ils génèrent des particules avec différents contenus magnétiques en faisant croître successivement les nanoparticules dans le gel, une procédure qui peut être utilisée pour augmenter la magnétisation de saturation jusqu'à 42 emu/g ([Suh et al., 2012], voir figures 3.2.B 3.2.C).

3.2.2 Limitations

Les nanoparticules ont une forte tendance à s'agréger à cause des interactions de Van der Waals de surfaces dès que la fraction volumique augmente et en pratique, la fraction volumique des nanoparticules est limitée à environ 10% ce qui confère une faible susceptibilité magnétique aux particules fabriquées (voir figure 3.2.A). De plus la présence d'agrégats limite l'homogénéité du dopage et rend très difficile le contrôle de la forme aux échelles micrométriques [Suter et al., 2011]. La fabrication in situ permet d'obtenir un contenu magnétique plus important que par lithographie mais les dimensions typiques rapportées sont de l'ordre de 100 μm ([Suh et al., 2012]), donc loin des dimensions qui nous intéressent (quelques micromètres). Également, il est

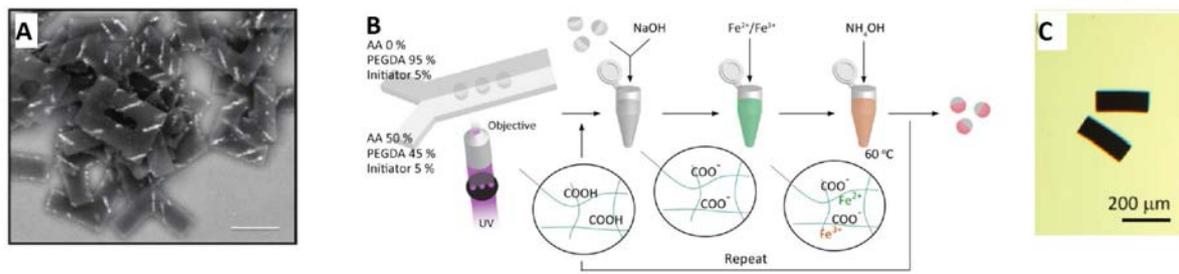


FIGURE 3.2 – A : Colloïdes superparamagnétiques obtenus par une technique de lithographie. Des agrégats linéaires de Fe_3O_4 sont clairement visibles au MEB. La barre d'échelle est de $10 \mu\text{m}$. D'après [Nunes et al., 2010]. B : Schéma du procédé de synthèse in situ, d'après [Suh et al., 2012]. C : Image de microparticules synthétisées in situ, d'après [Suh et al., 2012].

à noter qu'une fois les particules fabriquées, la question de la collecte reste elle aussi délicate [Rolland et al., 2005]. En général, les particules ne sont pas facile à extraire de leur moule, et s'agrègent entre elles ou s'attachent aux parois de leur contenant à cause de leurs propriétés de surface

3.3 Cylindres

Les méthodes précédentes ne suffisent pas pour fabriquer de formes superparamagnétiques de taille micrométrique, de géométrie contrôlée, et avec un contenu magnétique suffisamment élevé pour nos expériences. Nous avons développé une nouvelle méthode de fabrication de colloïdes superparamagnétiques par photolithographie dont la clé est de choisir judicieusement les particules et le monomère de façon à réduire leurs interactions de Van der Waals.

Les colloïdes superparamagnétiques que nous fabriquons ici sont contrôlés en taille, en forme et en composition, permettant de contourner les limitations existantes. Nous obtenons des particules monodisperses, pouvant descendre jusqu'à $4 \mu\text{m}$ en taille, de forme cylindrique (au sens mathématique du terme), avec un contenu magnétique pouvant atteindre 50% en masse. Nous détaillons tout d'abord leur fabrication (section 3.3.1), puis nous verrons leur caractérisation (sections 3.3.2 et 3.3.3).

3.3.1 Microfabrication des cylindres superparamagnétiques

Le procédé de fabrication des colloïdes superparamagnétiques développé au laboratoire fait intervenir plusieurs étapes dont le principe général est le suivant : Nous fabriquons des moules de PDMS contenant des puits ayant la forme des micro-objets désirés. Une solution de polymère contenant des particules superparamagnétiques est étalée sur les moules pour remplir les puits. Le tout est mis à réticuler pour solidifier les particules. Il faut ensuite extraire les particules des moules. Nous détaillons ici ces étapes.

Microfabrication de moules en PDMS contenant des puits micrométriques

La première étape est la fabrication d'un moule de polydiméthylsiloxane $—[O-Si(CH_3)_2]_n—$ (PDMS) contenant des puits de tailles micrométriques de formes contrôlées. Le principe est de couler le PDMS sur une résine pour en obtenir le négatif après réticulation.

Fabrication du wafer : Afin de fabriquer nos moules de PDMS, nous avons tout d'abord fabriqué un wafer de silicium comprenant les motifs désirés par photolithographie (voir figure 3.3.A). Nous faisons fabriquer des masques en chrome par la société *Selba* à partir d'un patron fait avec le logiciel de dessin *AutoCAD*. Les masques en chrome permettent une résolution sur les structures de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$ (figure 3.3.B). Une aligneuse en salle blanche permet d'irradier aux UV une résine SU8 préalablement spincoatée sur un wafer de silicium pour avoir une épaisseur contrôlée. Le SU-8 est une résine photosensible négative couramment utilisée dans la fabrication de micro-systèmes. Il s'agit d'un polymère très visqueux qui peut être tourné ou étalé sur une épaisseur allant de 1 micromètre à 2 millimètres. Son pic d'absorption maximale se situe dans l'ultraviolet, pour une longueur d'onde de 365 nm. Lorsqu'elle est exposée, les longues chaînes moléculaires de la résine SU-8 réticulent ce qui solidifie le matériau [Wikipédia]. La résine placée sous le masque réticule alors au niveau des parties exposées. Après révélation, c'est à dire dissolution de la résine non réticulée, on obtient le patron de masque voulu en résine de SU8 sur un wafer de silicium.

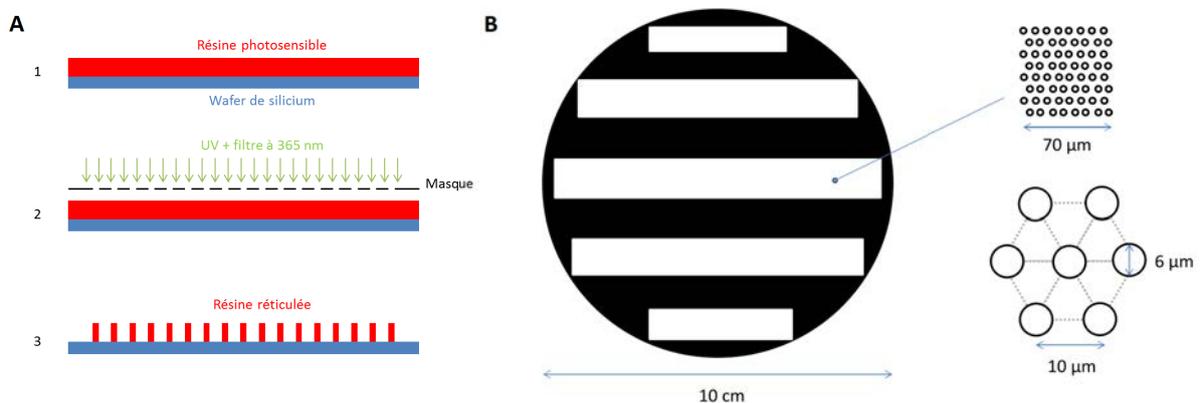


FIGURE 3.3 – A : Les étapes de fabrication du wafer. (1) Étalement d'une résine photosensible sur un wafer de silicium. (2) Exposition aux UVs à travers un masque en chrome. (3) Seule la résine ayant été exposée aux UVs a réticulé et reste sur le wafer après lavage. B : Exemple de masque utilisé pour réaliser la photolithographie. On dessine des réseaux hexagonaux de cylindres. On peut descendre jusqu'à des motifs de $2\ \mu\text{m}$ de diamètre, et pour une bonne résolution l'espace entre les formes doit être d'au moins $2\ \mu\text{m}$.

Fabrication des moules de PDMS et traitement de surface : Du PDMS (10 % en agent réticulant Sylgard) est ensuite versé sur ce masque et mis à réticuler à la chaleur. Après démoulage, on obtient ainsi le négatif de la résine SU8 en PDMS.

Afin de pouvoir remplir les moules par une suspension colloïdale en évitant la formation d'un film entre les particules, il faut contrôler l'état de surface du PDMS. Pour cela, elle est silanisée avec du trichlorosilane pour rendre la surface hydrophobe. Cette étape est essentielle dans le processus de fabrication et les conditions sont plus drastiques que les protocoles usuels de silanisation du PDMS. Pour cela, on lui applique un plasma à oxygène à 300 mTorr pendant 1 min 30 pour activer sa surface avec des groupements -OH, puis on la met en milieu anhydre sous atmosphère de chlorosilane 1H, 1H, 2H, 2H,-perfluorooctyltrichlorosilane (sous hotte aspirante pour éviter toute contamination) afin que la surface soit fonctionalisée avec des longues chaînes fluorées très peu réactives.

Pour pouvoir étaler la suspension colloïdale sans laisser de traces, il faut que la surface du PDMS soit parfaitement propre. Le processus de silanisation peut laisser des dépôts de plusieurs couches de silane, ce qui rend la surface rugueuse. Afin de nettoyer la surface, on dépose ensuite une nouvelle couche de PDMS sur le PDMS silanisé, et on les resépare après réticulation (ce qui est rendu possible car le silane empêche la cicatrisation du PDMS).

La surface de PDMS ainsi obtenue est hydrophobe, ce qui modifie les conditions de mouillage d'une goutte déposée dessus, un point clé pour notre expérience. Le moule obtenu est constitué de puits pouvant aller typiquement de 3 μm à 25 μm de profondeur pour des cylindres de 4 à 20 μm de diamètre. Ce procédé permet d'obtenir des puits en PDMS de taille, de géométrie, et de propriétés de surface contrôlées.

Fabrication des particules

Solution d'ETPTA et de billes superparamagnétiques Nous fabriquons une solution composée d'ethoxylated trimethylolpropanetriacrylate (ETPTA) et de particules superparamagnétiques recouvertes de silice de 300 nm de diamètre (Adem-beads, voir figure 3.4 et annexe B).

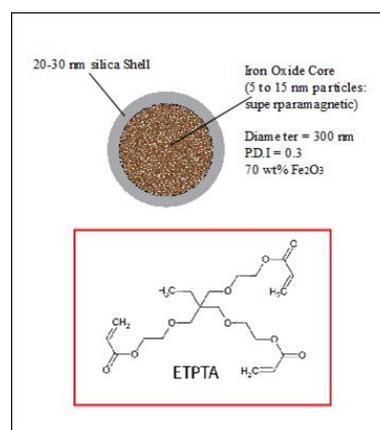


FIGURE 3.4 – Haut : Schéma d'une bille superparamagnétique de 300 nm de diamètre. Bas = Formule chimique développée de l'ETPTA

La combinaison ETPTA / billes de silice a été choisie pour conférer une bonne stabilité des billes dans la solution avant réticulation en réduisant les interactions de Van der Waals, ce qui les empêche de flocculer ([Jiang and McFarland, 2004]). En effet, parmi les forces pouvant jouer un

grand rôle dans l'agrégation des particules, il y a les forces de Van der Waals, qui agissent à très courte portée. Pour que la suspension colloïdale reste stable (ie. qu'il n'y ait pas de floculation), il faut diminuer les interactions de Van der Waals entre les particules. La force de Van der Waals entre les particules de même taille est donnée par $V_{vdW} = A \times f(a, h)$ où h est la séparation minimum entre les surfaces des particules, a est le rayon des particules, et A est la constante de Hamaker ([Lewis, 2000]) qui dépend des matériaux. La constante diélectrique et l'indice de réfraction des matériaux contribue à la constante de Hamaker :

$$A = C_1 + C_2 \frac{n_1^2 - n_2^2}{(n_1^2 + n_2^2)^{3/2}} \quad (3.1)$$

avec C_1 et C_2 des constantes et $C_2 \gg C_1$, et n_1 et n_2 les indices de réfractifs des matériaux ([Auernhammer et al., 2008]). En approchant au maximum la valeur des deux indices de réfraction on peut ainsi diminuer fortement les forces de Van der Waals, et donc les forces d'attraction entre les particules. C'est ce qui nous a guidés dans le choix du couple colloïdes/monomère. Ici, les indices de réfractifs des matériaux sont de 1.42 pour les particules recouvertes de silice et de 1.47 pour l'ETPTA, ce qui est proche et réduit donc considérablement les interactions de Van der Waals.

Grâce à ce processus, on est capable de créer des solutions avec des fractions volumiques de billes très élevées (jusqu'à 50%) sans qu'il se forme des agrégats. Ceci permet d'atteindre des contenus magnétiques élevés, et n'était pas réalisable avec les méthodes de fabrication existantes qui obtenaient des fractions volumiques de l'ordre de 10% au maximum.

Remplissage des puits de PDMS La solution est alors versée dans les puits du moule de PDMS silanisé.

Pour ce faire, nous étalons une goutte de solution à la surface du moule de PDMS en la déplaçant avec un cône de micropipette. Les propriétés de mouillage entre cette goutte et la surface de PDMS sont cruciales pour que cela fonctionne, d'où l'importance du traitement de surface vu en section 3.3.1. En effet, la goutte ne doit pas laisser de traces sur la surface de PDMS, donc l'affinité entre la goutte et le PDMS ne doit pas être trop grande pour que la goutte se rétracte sur elle-même après étalement. Il faut aussi que la solution rentre dans des puits de quelques micromètres de diamètre, et y reste lorsque l'on déplace la goutte. Après le passage de la goutte, l'échantillon est mis à dégazer sous atmosphère d'ETPTA pour chasser l'air potentiellement emprisonné au fond des puits, ainsi que pour faire évaporer l'éthanol de la solution (ce dernier est présent en petite quantité pour fluidifier la solution). On répète la procédure de remplissage deux ou trois fois afin de remplir les puits au maximum.

Réticulation L'échantillon est ensuite mis à réticuler sous UV (254 nm) grâce à du 2-hydroxy-2-méthyl-1-phenyl-propan-1-one (Sigma), un photoinitiateur introduit à 10 % en masse dans l'ETPTA. On obtient alors des colloïdes superparamagnétiques pris dans les puits de PDMS.

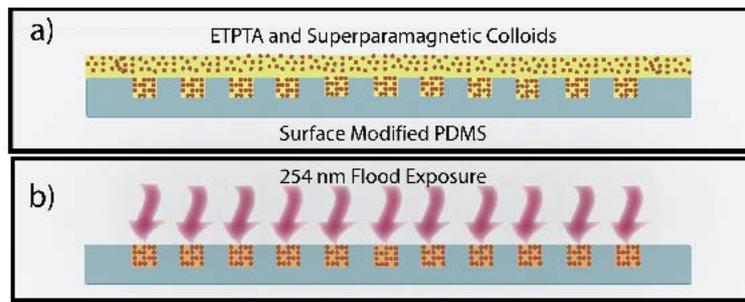


FIGURE 3.5 – Les étapes de remplissage des puits et de réticulation.

Extraction

Une fois les particules réticulées, il faut les extraire. Grâce à la silanisation de la surface du PDMS qui rend cette dernière hydrophobe, les cylindres nouvellement formés ne sont pas attachés au moule et peuvent ainsi être extraits. Nous présentons ici deux méthodes pour collecter les particules.

Extraction en solution : Une première méthode consiste à plier un morceau de PDMS contenant les cylindres (comme on ferait pour démouler un gâteau) dans un ependorf rempli d'une solution de protéines (BSA ou VCA en général), et de mettre l'ependorf au bain à ultrasons. Les cylindres tombent alors au fond du tube, et les protéines se collent à leur surface, ce qui permet de les passiver ou de les activer. Cela est très efficace et permet de récupérer des cylindres par milliers. Bien que ne gardant pas la position initiale des colloïdes, cette méthode est particulièrement adaptée pour nos expériences de biophysique, ce que nous verrons en section 3.4.

Sur les figures 3.6 et 3.7 on voit des images des particules que l'on peut obtenir (étoiles, losanges, cylindres, etc.), ainsi que la façon dont elles s'auto-organisent sous champ magnétique (selon leur plus longue dimension).

Contrôle de la position initiale des particules Une couche de poly(1-vinyl-pyrrolidone-co-vinylacetate) (P(VP-VA)) à 70 wt% en isopropanol (Sigma) est étalée sur une lame de verre. L'isopropanol s'évapore après un moment, et le polymère est alors très visqueux et collant. Le moule de PDMS contenant les colloïdes est alors imprimé dessus. Un double effet se produit ici. Les colloïdes se collent au PVP-VA, et l'alcool contenu dans ce produit pénètre dans le PDMS, ce qui le fait gonfler et ainsi augmente la taille des puits, libérant plus facilement les colloïdes. Après séchage du PVP-VA (30 min environ) le PDMS est retiré et les colloïdes restent attachés au PVP-VA, tout en gardant l'organisation initiale, i.e celle du masque (voir figure 3.8).

Cela permet d'étudier les propriétés d'auto assemblage de colloïdes de différentes formes à partir d'une position donnée. Pour ce faire, nous mettons l'échantillon sous un champ magnétique puis nous dissolvons doucement le PVP-VA en ajoutant quelques gouttes d'un mélange d'isopropanol et d'éthylène glycol. Les colloïdes sont alors libres de se déplacer et d'interagir en réponse au champ magnétique appliqué (voir image 3.9). Ces travaux concernant l'auto-organisation des

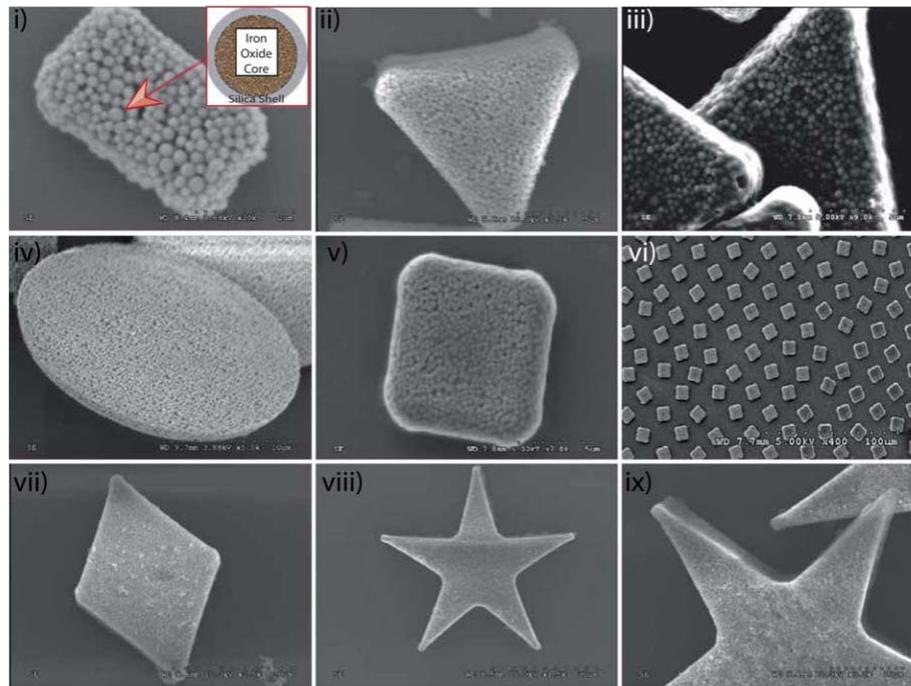


FIGURE 3.6 – Images des particules en microscopie électronique. (i)-(ix) Différentes géométries. Dans (i)-(v) on peut voir les colloïdes de 300 nm en close packing au sein de la matrice d'ETPTA.

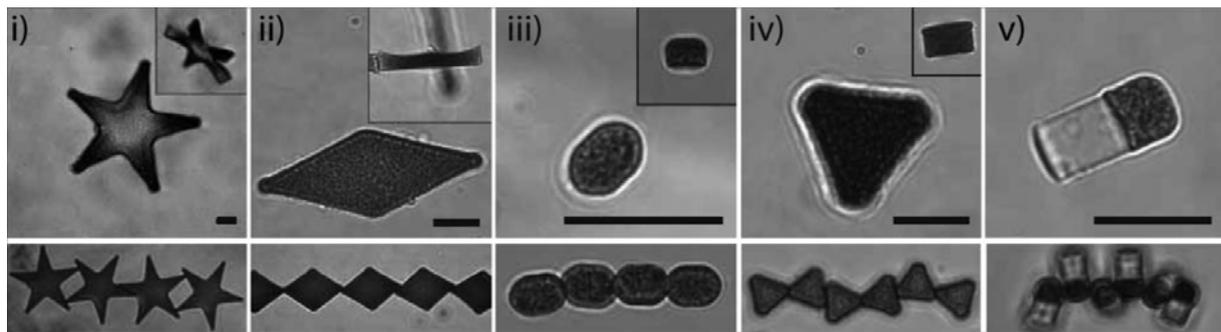


FIGURE 3.7 – Contrôle sur la géométrie et les dimensions des particules superparamagnétiques. Sélection de particules (ligne du haut) et leur chaînage sous un champ magnétique homogène (ligne du bas). Dès que le champ magnétique est appliqué, les particules forment des chaînes selon leur plus longue dimension alignée avec le champ (plus longue dimension superparamagnétique dans les cas des particules Janus, panneau v).

colloïdes selon leur forme et leur position initiale ont été publiés dans [Tavacoli et al., 2013].

Cette méthode est particulièrement adaptée pour étudier des phénomènes d'auto-organisation, mais l'est beaucoup moins pour faire de la biochimie. En effet, nous avons besoin de pouvoir récupérer les colloïdes pour leur greffer des protéines afin de faire pousser des gels d'actine. La chimie de surface va donc jouer un rôle important. Ici, lorsque les colloïdes se touchent, ils restent collés entre eux, ce qui n'est pas adapté à notre besoin. De plus, le passage dans le PVP-VA modifie les propriétés de surface des cylindres, et présente un problème de biocompatibilité.

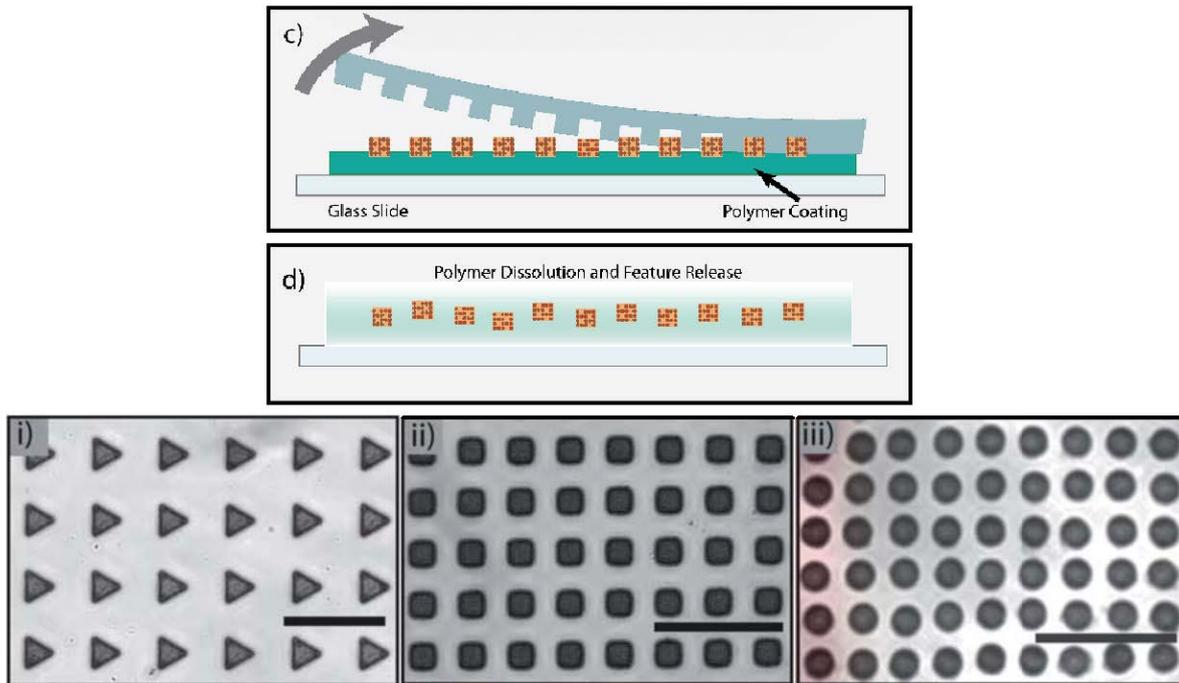


FIGURE 3.8 – En haut : procédé d'extraction des particules par la méthode d'impression sur du PVP-VA. En bas : images en champ clair de particules superparamagnétiques extraites en tableaux réguliers. Barre d'échelle : $40 \mu\text{m}$.

Réalisation de tapis de pavés magnétiques A partir de la méthode de fabrication des cylindres superparamagnétiques, nous avons également développé une méthode permettant de fabriquer des surfaces de PDMS recouvertes de textures superparamagnétiques telles que des pavés parallélépipédiques, des pointes ou des cylindres.

Pour ce faire, suite à la réticulation des colloïdes dans leur moule de PDMS, nous étalons une fine couche de PDMS sur le PDMS contenant les formes grâce à un procédé de "spincoating". L'épaisseur étalée est généralement d'une centaine de microns. La nouvelle couche s'accroche alors aux colloïdes superparamagnétiques, mais pas à l'ancien PDMS qui avait été silanisé dans une étape précédente. Après réticulation, on peut décoller délicatement cette fine couche de PDMS, et les formes superparamagnétiques sont alors dessus (voir figure 3.11).

3.3.2 Mesure de la susceptibilité magnétique des cylindres

Afin de connaître la susceptibilité magnétique volumique des cylindres fabriqués, nous étudions leur réponse à un gradient de champ magnétique. Pour ce faire, nous mettons les cylindres dans l'eau sous un gradient de champ magnétique, et nous suivons leur déplacement sous l'effet de la force magnétique qui les met en mouvement et qui s'oppose à la force visqueuse.

En notant ρ la masse volumique du milieu, de 10^3 kg.m^{-3} , V la vitesse du cylindre, de l'ordre de $1 \mu\text{m.s}^{-1}$, L la longueur caractéristique du problème, soit la longueur ou le diamètre d'un cylindre, de l'ordre de $10 \mu\text{m}$, et η la viscosité dynamique du milieu, de 10^{-5} Pa.s , le nombre de

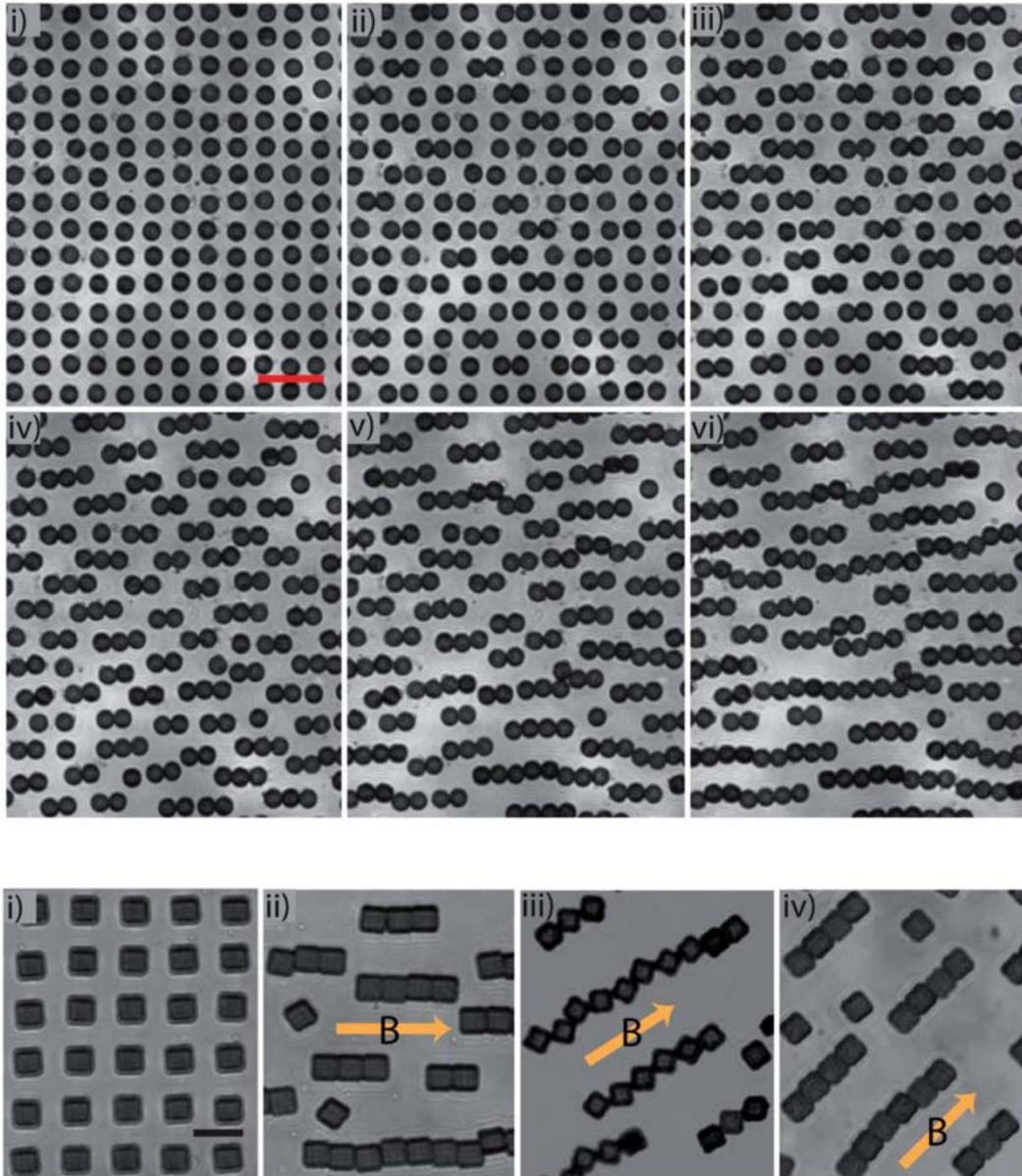


FIGURE 3.9 – Auto-assemblage de colloïdes superparamagnétiques selon leur position initiale.

Reynolds associé vaut

$$Re = \frac{\rho V L}{\eta} \sim 10^{-3} \ll 1 \quad (3.2)$$

ce qui correspond à un régime visqueux. Ainsi, la mesure de leur vitesse permet de calculer la force de trainée de Stokes exercée sur ces mêmes cylindres, qui est égale à la force magnétique.

$$\vec{F}_{magnétique} = -\vec{F}_{visqueuse} \quad (3.3)$$

La force magnétique nominale est :

$$\vec{F}_{magnétique\ calculée} = M.V.\overrightarrow{grad}(\vec{B}) \quad (3.4)$$

avec M la magnétisation nominale à un champ donné, V le volume de la particule mesuré à

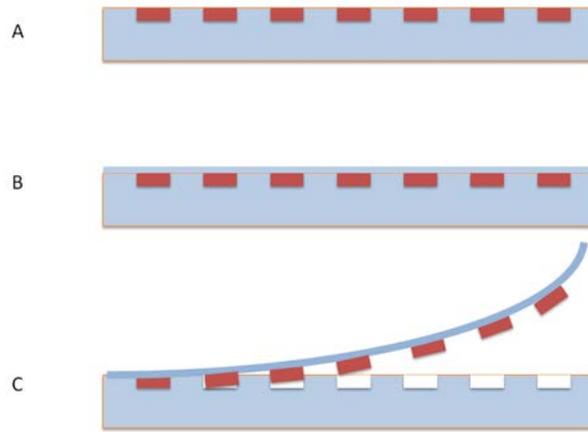


FIGURE 3.10 – Fabrication des pavés superparamagnétiques. A : PDMS silanisé contenant des pavés superparamagnétiques réticulés. B : Spincoating d'une fine couche de PDMS. C : Extraction des blocs après réticulation du PDMS spincoaté.

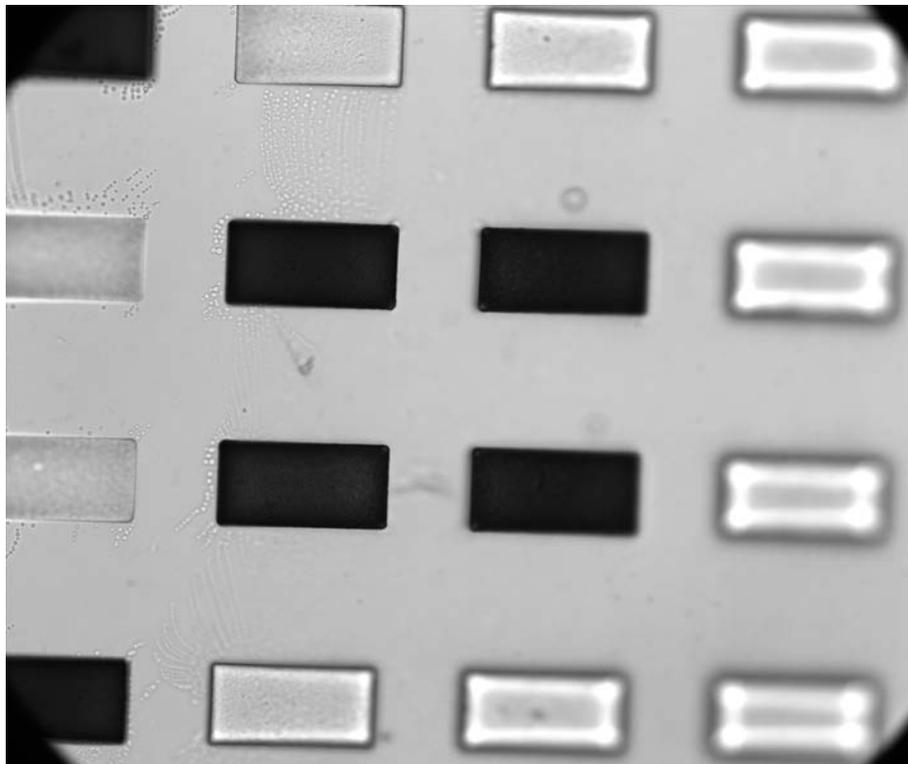


FIGURE 3.11 – Pavés de dimensions 150x100x50 μm extraits sur une fine couche de PDMS.

partir des images, et $\overrightarrow{\text{grad}}(\vec{B})$ le gradient de champ magnétique.

La force magnétique mesurée est obtenue à partir de l'équilibre avec la force de traînée de Stokes :

$$\vec{F}_{\text{visqueuse}} = -6.\pi.\eta.R_{eq}.f_{\text{cylindre}}.\vec{U} \quad (3.5)$$

avec η la viscosité de l'eau, R_{eq} le rayon équivalent d'une sphère de même volume que le cylindre, f_{cylindre} un facteur de correction prenant en compte la forme du cylindre ([Allison,

1999]), et \vec{U} la vitesse du cylindre. La différence entre les magnétisations nominales et calculées est déduite d'un fit linéaire de la force nominale par rapport à la force magnétique mesurée (voir figure 3.13.b).

La susceptibilité volumique des cylindres est déduite des données de magnétisation des colloïdes superparamagnétiques de 300 nm de diamètre de AdemTech (décrite par la courbe figure 3.12) et du rapport volumique nominal entre les colloïdes, ce qui permet d'en déduire la magnétisation des cylindres). On obtient la courbe B-H suivante :

$$B = \mu_0 \times (7453[A/m]) \times \tanh \frac{H}{1.915e4[A/m]} + 1.1055 \times H \quad (3.6)$$

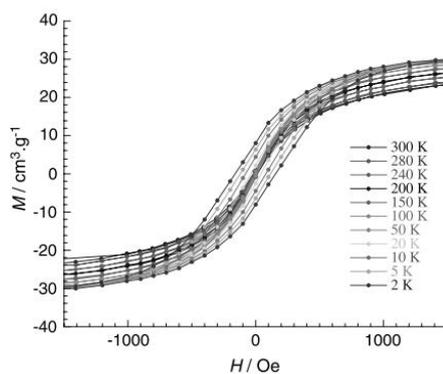


FIGURE 3.12 – Courbe de magnétisation des billes Ademtech de 300 nm à différentes températures. D'après [Johnson et al., 2008].

En pratique, pour éviter les interactions entre les cylindres et les bords de la chambre microfluidique, nous faisons monter les cylindres en haut de la chambre avec un aimant juste avant le début de l'expérience. Nous enregistrons des films de cylindres migrant sous champ magnétique et sédimentant en même temps, et nous faisons le kymographe du film à partir duquel nous mesurons la vitesse des cylindres (voir figure 3.13). La vitesse des cylindres est constante, jusqu'à ce qu'ils soient trop près de la paroi du fond de la chambre où ils ralentissent.

3.3.3 Calcul de la force d'interaction entre deux cylindres

Pour réaliser nos expériences, nous avons besoin de connaître la force d'interaction entre deux cylindres en fonction de leur distance, de leur taille et du champ magnétique appliqué, afin de connaître la contrainte exercée sur les gels d'actine. Contrairement à l'interaction entre deux billes, il n'y a pas de formule analytique pour estimer la force entre deux cylindres. Nous devons donc la calculer numériquement. La connaissance du contenu magnétique des cylindres va nous être utile pour simuler cette force d'attraction.

Pour simuler la force entre deux cylindres superparamagnétiques, on utilise le logiciel COMSOL Multiphysics, un logiciel de simulations numériques basé sur la méthode des éléments finis. La méthode des éléments-finis est une méthode d'approximation numérique de solutions de

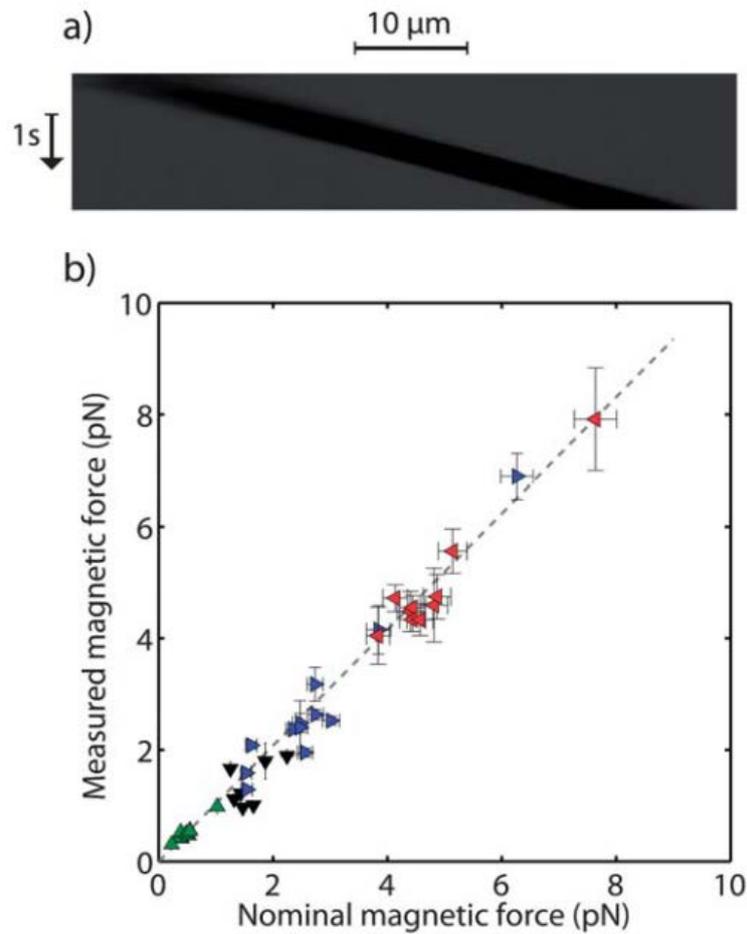


FIGURE 3.13 – Mesure de la magnétisation des cylindres. (a) Kymographe extrait d'un film d'un cylindre superparamagnétique migrant dans un gradient de $0.746 \text{ T}\cdot\text{m}^{-1}$ (champ : 20 mT). Les zones moins nettes sont dues à la sédimentation de la particule. Le gradient est orienté vers la droite et le temps vers le bas de l'image. (b) Graphique de la force magnétique nominale en fonction de la force magnétique mesurée extraite de la vitesse des cylindres (diamètre : $4.5\text{-}7 \mu\text{m}$, longueur : $7\text{-}18 \mu\text{m}$) bougeant dans un champ magnétique à différentes intensités (triangles pointant vers le haut : 10 mT, vers le bas : 20 mT, vers le droite : 30 mT, vers la gauche : 40 mT). Les barres d'erreur sont calculées à partir de l'incertitude sur la mesure de la vitesse et sur le volume des cylindres. La ligne pointillée est un fit linéaire de pente 1.04. D'après [Tavacoli et al., 2013].

problèmes aux limites statiques ou dynamiques tels qu'en mécanique des fluides ou en électromagnétisme, qui peut s'étendre à n'importe quel problème d'équations aux dérivées partielles aux limites ([Cho, 2010]) pour trouver une approximation discrète d'un problème différentiel linéaire. L'appellation éléments finis vient de la décomposition du domaine d'étude en éléments représentés par un maillage. La méthode des éléments finis n'était précisément pas l'objet de cette thèse, et à ici été utilisée comme un outil. Nous allons voir comment elle a été implémentée et quels sont les principaux résultats concernant la force d'attraction entre des cylindres superparamagnétiques soumis à un champ magnétique.

Géométrie utilisée

La première étape de la méthode des éléments finis est de définir la géométrie à considérer. Nous avons ici dessiné deux cylindres de diamètre $6 \mu\text{m}$ pour une longueur de $12 \mu\text{m}$ et les avons espacés de $1 \mu\text{m}$. Plus tard nous ferons varier ces paramètres pour balayer une large gamme de situations possibles. Le tout se trouve dans un parallélépipède de dimensions grandes devant la taille des cylindres. Les bords des cylindres sont arrondis avec un rayon de courbure de $0.5 \mu\text{m}$ car des bords trop nets provoquent des discontinuités dans le calcul des éléments finis (voir figure ??).

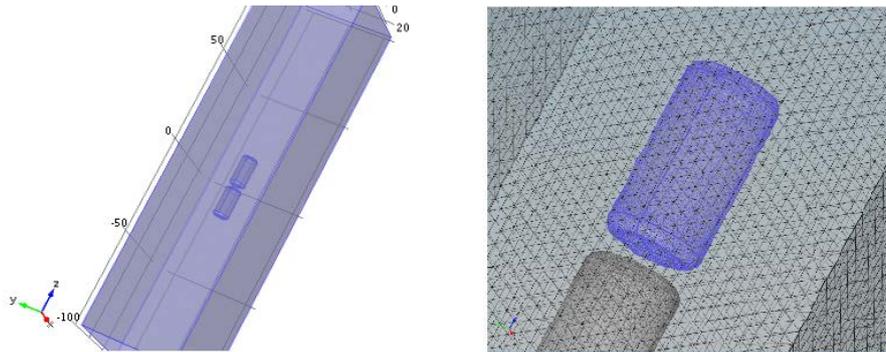


FIGURE 3.14 – Géométrie utilisée. (Gauche) On peut voir les deux cylindres au sein d’un parallélépipède grand par rapport aux cylindres. (Droite) Zoom sur un cylindre dont on a affiché le maillage. On peut voir que les bords sont arrondis.

Physique - Module AC/DC

L’étape suivante consiste à rentrer les éléments nécessaires à la physique du problème considéré, c’est à dire les propriétés des matériaux, les conditions aux limites et les forces à calculer. Nous imposons le champ magnétique normal aux faces amont et aval du parallélépipède de 40 mT. Ce paramètre pourra également varier. Sur les faces latérales, nous imposons un champ normal nul. La magnétisation des cylindres a été caractérisée précédemment.

Maillage

En pratique, le logiciel COMSOL permet de générer des maillages automatiquement, en raffinant des zones si nécessaire. Pour s’assurer que le maillage que nous réalisons est suffisant, nous faisons tourner la simulation pour un maillage ainsi que pour un autre plus fin. Si les deux solutions sont identiques, c’est que le premier maillage était suffisant.

Résultats

Les calculs sont faits en faisant varier différents paramètres, qui sont les longueurs et diamètres des cylindres, et la distance entre les cylindres. Sur la figure 3.15 à gauche on observe l’évolution de la force en fonction de la distance entre deux cylindres de diamètre $6 \mu\text{m}$ et de longueur $10 \mu\text{m}$, pour un champ de 40 mT. On voit qu’à cette valeur de champ, on peut atteindre

des forces entre les cylindres de l'ordre du nanonewton.

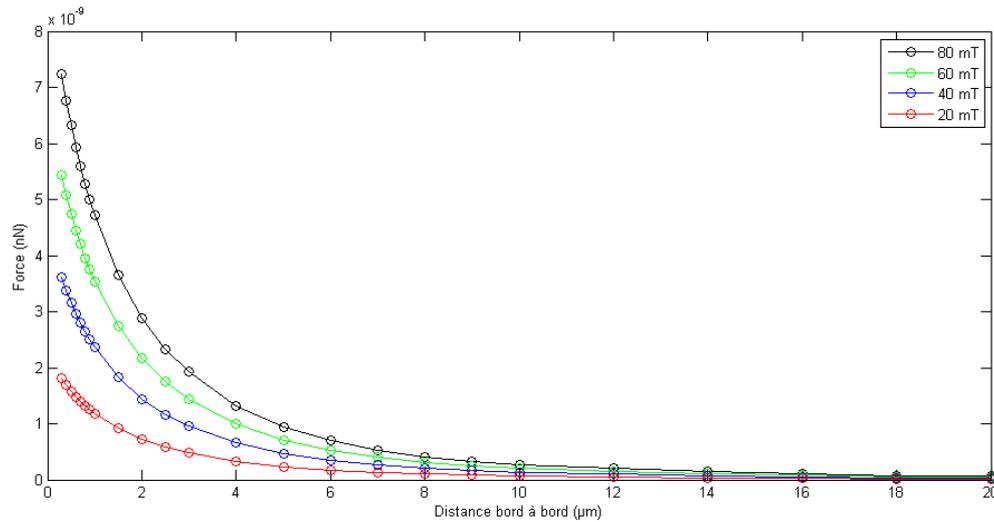


FIGURE 3.15 – Évolution de la force en fonction de la distance entre deux cylindres de diamètre $6 \mu\text{m}$ et de longueur $12 \mu\text{m}$ pour différentes valeurs de champ.

Sur la figure 3.15 à droite on observe l'évolution de la force en fonction de la distance entre les cylindres pour différentes valeurs de champ. On voit que la force est multipliée par 2 quand le champ est lui aussi multiplié par 2. Ainsi, une seule valeur de champ magnétique est nécessaire pour effectuer les simulations numériques, car les forces à différents champs se déduisent aisément en appliquant un facteur de proportionnalité.

Valeur approchée : En traçant les valeurs de la figure 3.15 de la manière suivante : $\log(F) = f(\log(d + 2 \times R))$, avec F la force magnétique, d la distance bord à bord entre les cylindres, et R le rayon d'un cylindre, on obtient la courbe tracée en figure 3.16. Un fit linéaire de cette courbe donne un coefficient directeur de -3.6, ce qui permet d'obtenir une loi d'évolution de la force magnétique de la forme :

$$F \propto \frac{1}{(d + 2 \times R)^{3.6}} \quad (3.7)$$

Calcul de la force dans le cas général : Ces résultats discrets servent de base pour la suite des calculs. La force dépend du diamètre d et des longueurs L_1 et L_2 de chaque cylindre ainsi que de la distance bord à bord h . En pratique on s'est limité à un seul diamètre avec des longueurs variables. Une courbe $F(h)$ est générée par interpolation de $F_h(L_1, L_2)$ pour chaque couple de cylindre.

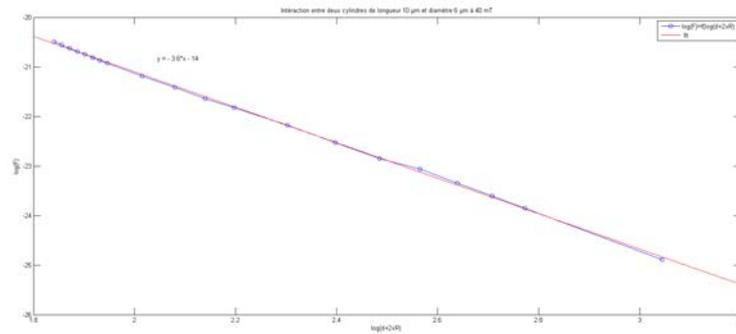


FIGURE 3.16 – Loi de variation de la force en fonction de la distance bord à bord des cylindres et de leur rayon.

Validation de la méthode des éléments finis - Application au calcul des interactions entre billes

Pour valider la méthode par éléments finis, nous avons également effectué la simulation de l'interaction dipolaire entre deux billes superparamagnétiques de $4 \mu\text{m}$ de diamètre que nous avons comparé à la formule analytique. On voit sur le graphique de la figure 3.17 que les deux courbes sont très similaires, (elles diffèrent de 3% au maximum), ce qui est concluant.

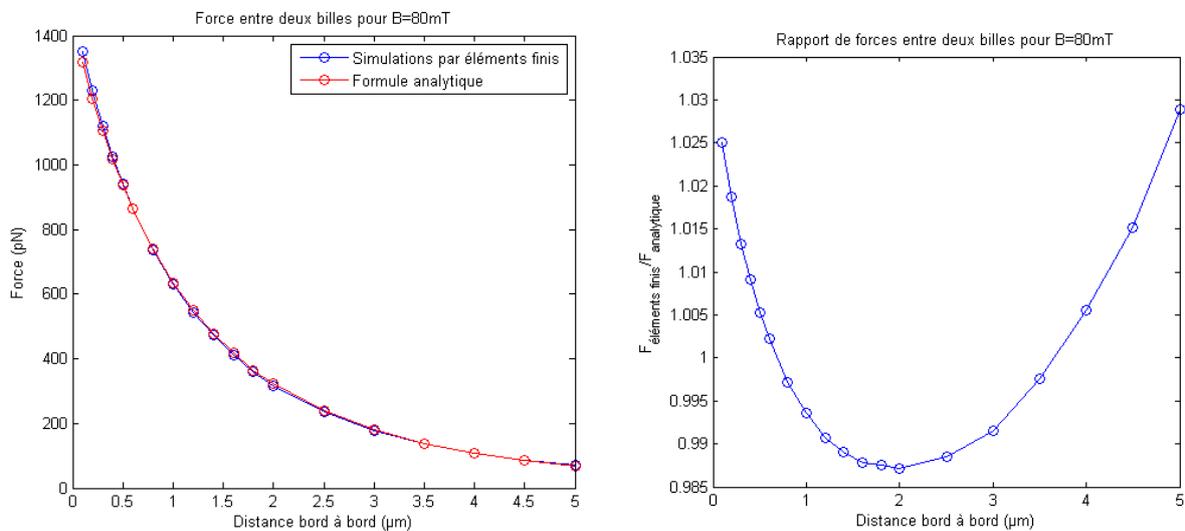


FIGURE 3.17 – Gauche : Simulations et calcul de la force exercée entre deux billes de $4 \mu\text{m}$ de diamètre sous un champ magnétique de 80 mT. Droite : Rapport des forces simulées et calculées.

Conclusion : Nous sommes capables de fabriquer des cylindres superparamagnétiques de taille et de contenu magnétique contrôlés, en très grand nombre (environ 1 000 000 de cylindres de $6 \mu\text{m}$ de diamètre par cm^2), et pouvons mesurer la force d'interaction entre deux cylindres en fonction de leur taille, de leur distance, et du champ magnétique appliqué.

3.4 Reconstitution de gels d'actine *in vitro* à la surface de colloïdes superparamagnétiques

Nous nous intéressons ici à la fonctionnalisation des cylindres par la VCA, un domaine de la protéine N-WASP permettant d'activer le nucléateur Arp2/3 afin de reconstituer des gels d'actine denses et branchés à partir d'une surface (cf section 1.5).

3.4.1 Méthodes de fonctionnalisation des cylindres

Nous employons deux méthodes de fonctionnalisation des surfaces des cylindres selon les besoins de l'expérience :

Fonctionnalisation totale des cylindres : Une première méthode consiste à fonctionnaliser toutes les faces des cylindres avec le domaine VCA de N-WASP. Pour ce faire, ils sont directement extraits par ultrasons dans une solution de VCA en large excès par rapport à la surface disponible (voir figure 3.18). Les cylindres sont ensuite mis sur roue au frigo (température entre 4°C et 6°C) pendant une heure pour laisser le temps à la VCA de fonctionnaliser toute la surface des cylindres. La VCA utilisée est liée à un tag GST (Glutathione S-Transferase), qui est gros par rapport à VCA, et qui va donc s'attacher avec une plus grande probabilité à la surface des cylindres par adhésions non spécifiques, ce qui permet à la VCA de rester fonctionnelle. On ajoute ensuite une solution de BSA (bovine serum albumin) à 1% en masse pendant 15 minutes pour passiver les surfaces non recouvertes de VCA, puis nous rinçons. Les cylindres fonctionnalisés se conservent 48h sur glace.

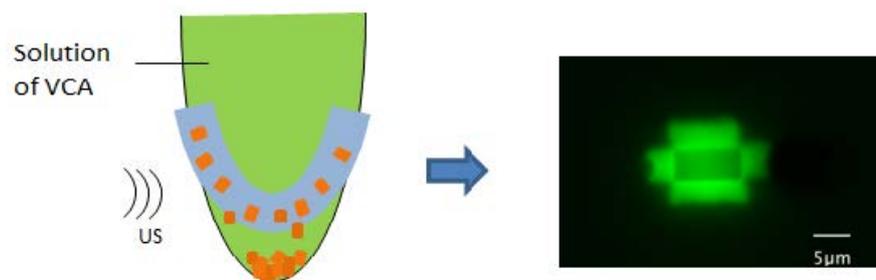


FIGURE 3.18 – Fonctionnalisation totale des cylindres.

Fonctionnalisation des cylindres sur une seule face : Il est aussi possible de fonctionnaliser seulement une des faces des cylindres avec un domaine de N-WASP tel que VCA, tout en passivant les autres faces. Pour ce faire, quand les cylindres sont encore dans leur moule de PDMS, nous mettons une goutte contenant le domaine VCA à la surface du PDMS que nous laissons pendant une heure au frigo sous atmosphère saturée en eau pour éviter l'évaporation. Nous faisons ensuite tomber les cylindres par ultrasons dans un ependorf rempli d'une solution de BSA pour passiver les autres faces des cylindres et les sites non recouverts par VCA. La dernière étape consiste à rincer les cylindres. Ils peuvent ensuite être gardés au moins 48h sur glace (voir figure 3.19).

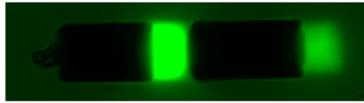


FIGURE 3.19 – Fonctionnalisation d’une seule surface de cylindres de $6\mu\text{m}$ de diamètre.

Géométrie des cylindres et quantité typique utilisée : Les cylindres que nous utilisons pour nos expériences font $6\mu\text{m}$ de diamètre et typiquement $12\mu\text{m}$ de hauteur. Disposés dans le PDMS en un réseau de symétrie hexagonale de pas de $10\mu\text{m}$, on a l’équivalent de 2 cylindres sur $100\sqrt{3}\mu\text{m}^2$, soit de l’ordre de 200 000 cylindres sur une surface de 2 mm par 8 mm (ce que nous utilisons typiquement). Ainsi, la surface totale des cylindres extraits est de l’ordre du cm^2 .

3.4.2 Mélange de croissance

Afin de reconstituer des gels d’actine *in vitro* à la surface des cylindres suivant la machinerie Arp2/3 décrite en section 1.5, nous devons réaliser un mélange de protéines (actine, Arp2/3, gelsoline, ADF cofiline, ATP, le tout dans un milieu tamponné) dans lequel nous pourrions mettre les cylindres fonctionnalisés.

L’actine F est préparée en amont. On part d’une solution d’actine-G liée à Ca^{2+} , à laquelle on ajoute du KCl pour favoriser la polymérisation, ainsi que de l’EGTA et du MgCl_2 . L’EGTA, un chélatant de Ca^{2+} capture ce dernier, qui est alors remplacé par Mg^{2+} . Ainsi, l’actine polymérise sous forme F pour atteindre la concentration d’équilibre en actine-G. L’actine contient aussi des monomères liés à Alexa 488, un fluorophore de fréquence d’excitation 499 nm et de fréquence d’émission 519 nm en proportion de 5%.

Le mélange de croissance contenant les protéines de la machinerie Arp2/3 est préparé comme suit. Nous mélangeons Arp2/3 (pour des concentrations allant de 10 à 180 nM), gelsoline (90 nM), ADF ($6.8\mu\text{M}$) avec de l’ATP (1.8 mM) qui sert de réserve d’énergie, avec du Dabco et du DTT pour limiter les effets du photoblanchiment, dans un tampon X contenant de la BSA à 0.1% en masse (la composition des tampons est donnée en Annexe A). On ajoute ensuite l’actine sous forme F tel que la concentration finale en actine soit de $6.8\mu\text{M}$. Toutes les protéines que nous utilisons nous ont été fournies par l’équipe de Marie-France Carlier du laboratoire d’enzymologie et de biochimie structurales de Gif sur Yvette.

3.4.3 Préparation de l’échantillon

On prépare une chambre de largeur 1-2 mm et d’environ 6 microlitres de volume entre une lame et une lamelle séparées par du parafilm. Elle est ensuite remplie de BSA 10% pendant 45 min puis rincée à l’eau avant utilisation pour passer les surfaces de la chambre en BSA et ainsi limiter l’adhésion non spécifique.

Une fois le mélange de protéines prêt, on le mélange à des cylindres fonctionnalisés avec VCA, et on met le tout dans la chambre (typiquement $5\mu\text{L}$). Cette dernière est scellée avec du VaLaP

(Vaseline, Lanoline, Paraffine dans les mêmes proportions), une "cire" biocompatible.

3.5 Montage expérimental

Le but du montage expérimental est de pouvoir générer un champ magnétique homogène, contrôlé et modifiable au niveau de l'échantillon, de pouvoir observer ce dernier et de prendre des acquisitions à haute fréquence, ainsi que de pouvoir faire des images de fluorescence pour visualiser les réseaux d'actine.

Microscopie et contrôle du champ magnétique : Le montage expérimental est composé d'un microscope inversé Zeiss axio A1 avec un objectif x100 à immersion ayant une ouverture numérique de 1.4. Le tout repose sur une table optique pour diminuer les vibrations. De part et d'autre de l'objectif se trouvent deux bobines (longueur 40 mm, diamètre intérieur 26 mm, diamètre extérieur 88 mm, 750 spires) en configuration pseudo-Helmholtz (voir image 3.20). L'intérieur des bobines contient un coeur de mu-métal permettant d'augmenter et de concentrer les lignes de champ magnétique. Le champ entre les deux bobines est homogène au centre sur la taille de la chambre, puis les lignes de champ s'écartent peu à peu quand on va vers les bords, créant un gradient qui est dû à la configuration pseudo-Helmholtz. La description du champ magnétique ainsi généré a été largement développée dans la thèse de Thomas Pujol ([Pujol et al., 2012]).

Le champ magnétique créé est proportionnel au courant I traversant les bobines. Ce courant est délivré par un amplificateur idéal de courant appelée BOP (Bipolar Operational Power supply amplifier) de 6A pouvant délivrer jusqu'à 200W. Elle fournit une intensité proportionnelle à la tension de consigne générée par l'ordinateur. La tension de consigne est générée par un programme Labview qui communique avec la BOP via une carte d'acquisition (*cf* schéma 3.21). Un étalonnage du champ magnétique en fonction de la tension de consigne est réalisé avant chaque expérience avec un teslamètre, car celui-ci dépend fortement de l'écartement des bobines. Le set-up permet de générer des champs magnétiques variables dans le temps (rampes, escaliers, sinusoïdes,...), pour des valeurs de champ magnétique comprises entre 3 et 80 mT.

Contrôle de la température : Après un certain temps d'alimentation des bobines en tension, la température de ces dernières augmente sensiblement lorsque l'on reste à des plateaux de champs magnétiques élevés, ce qui a une influence sur le comportement des échantillons biologiques. Pour parer à cet effet, nous disposons de deux paires de bobines, et elles sont échangées entre chaque expérience pour permettre à la dernière paire utilisée de refroidir sur glace. Nous avons vérifié que la température ne variait pas plus de deux degrés au cours des expériences réalisées dans ces conditions.

Suivi de l'expérience : Le suivi de l'expérience se fait avec une caméra ORCA-Flash4.0 LT Digital CMOS C11440 ayant une grande dynamique (16 bits). Labview permet de synchroniser la caméra avec la mesure du champ généré par les bobines, et enregistre la valeur du champ au milieu de chaque image.

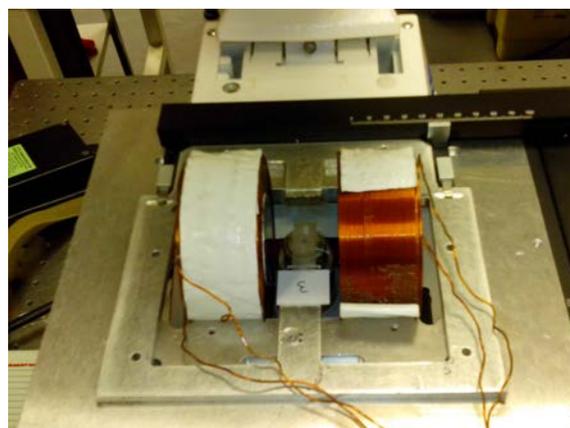


FIGURE 3.20 – Photos du montage expérimental. Gauche : On peut voir le microscope inversé comportant les deux bobines sur sa platine. Une caméra y est fixée. Le tout repose sur une table optique à coussin d'air pour éviter toute vibration. On voit également la lampe X-cite XPS-120 permettant de prendre les images de fluorescence. Droite : zoom sur lequel on peut voir l'échantillon sur l'objectif à immersion entre les deux bobines en configuration pseudo-Helmholtz.

Images de fluorescence : A la fin de chaque expérience, on prend une image de fluorescence avec une lampe X-cite XPS 120 pendant 100 ms à travers un filtre n°17 de Zeiss (longueur d'onde d'excitation : 450 nm, séparateur de faisceau : 510 nm, émission : 515-565 nm) pour voir le gel d'actine grâce à l'Alexaa488 (les gels sont peu visibles en fond clair). Cela nous permet de mesurer l'intensité de fluorescence des gels que l'on peut directement relier à la densité d'actine dans le gel.

Photodamage : Nous ne prenons des images de fluorescence qu'à la fin de nos expériences pour limiter le photodamage qui est dû à la libération de radicaux libres des fluorophores qui affectent les gels lors de l'exposition aux UVs. En effet, on peut voir sur la figure 3.22 à gauche un gel d'actine ayant poussé sur un colloïde et dont une image de fluorescence avec 100 ms de temps de pause a été prise au bout de 90 minutes de croissance. Sur l'image de droite, on peut voir des colloïdes du même échantillon dont on a pris une image de fluorescence avec 100 ms de temps de pause toutes les 2 minutes pendant 90 minutes. On voit que les gels ayant été plus longtemps exposés aux UVs sont plus courts et moins intenses que ceux qui n'ont pas été soumis aux UVs pendant la croissance, ce qui met en évidence le phénomène de photodamage.

Données obtenues : Grâce aux caméras CMOS on peut suivre une chaîne pendant 30 minutes à 33 images par secondes. Les films typiques que nous réalisons font environ 16 Go (5332 images

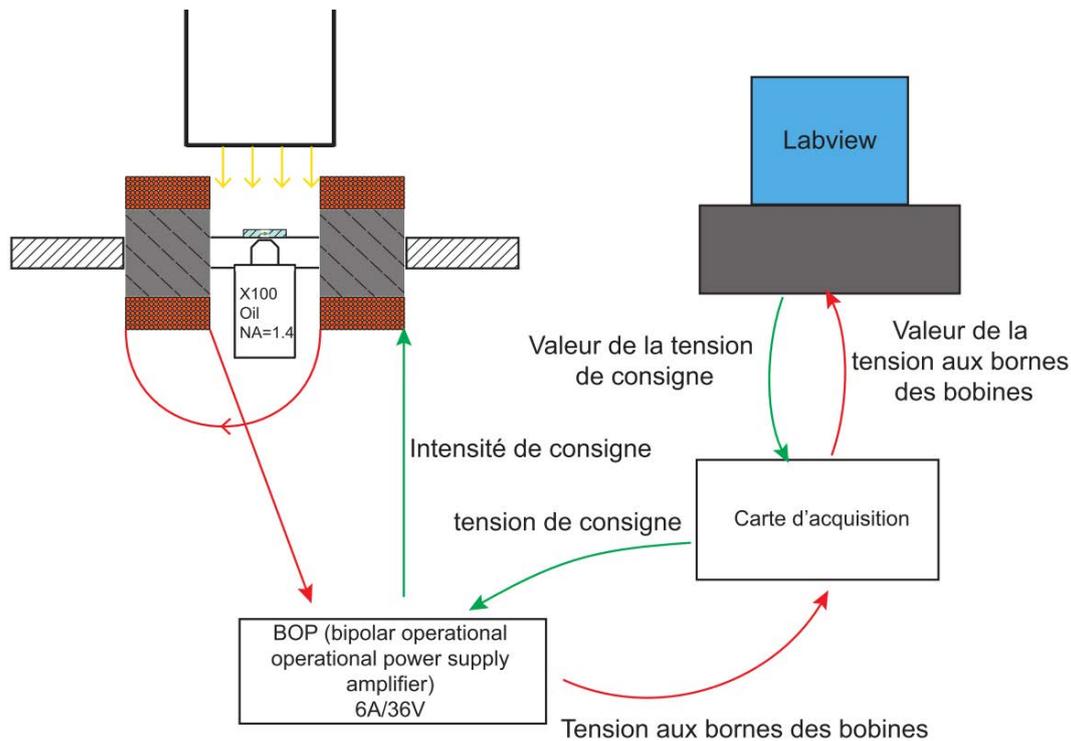


FIGURE 3.21 – Schéma du montage expérimental

de 3.12 Mo de 2048 x 800 pixels codées sur 16 bits), ce qui donne de l'ordre de 10 To de données brutes en trois mois d'expériences. Les résultats bruts des expériences sont des films sur lesquels on observe l'évolution dans le temps de chaînes de cylindres dont le mouvement est dû à la force générée par la croissance des gels d'actine et aux variations de champ magnétique.

3.6 Traitement d'images

On ne mesure pas directement la taille du gel en fluorescence (à cause de l'imprécision de la mesure et du photodamage) mais on la déduit de la distance entre les cylindres. Ainsi, pour suivre l'évolution de l'épaisseur des gels d'actine en fonction du champ magnétique appliqué et au cours du temps, nous avons besoin d'une mesure très précise de l'évolution de la distance entre les cylindres. Pour cela nous avons développé un programme de corrélation d'images permettant de suivre le déplacement des cylindres lors d'une acquisition.

3.6.1 Corrélation subpixels d'images

On retrouve la position des particules par corrélation sub-pixels d'images sous matlab. La granulosité des particules rend ce procédé très efficace. Nous allons décrire le principe de la corrélation, ainsi que détailler la méthode utilisée dans cette thèse.

Définition de la corrélation :

On veut mesurer le déplacement d'une région d'intérêt entre deux images. Le principe de corrélation consiste à rechercher dans une seconde image l'endroit ressemblant le plus à la région

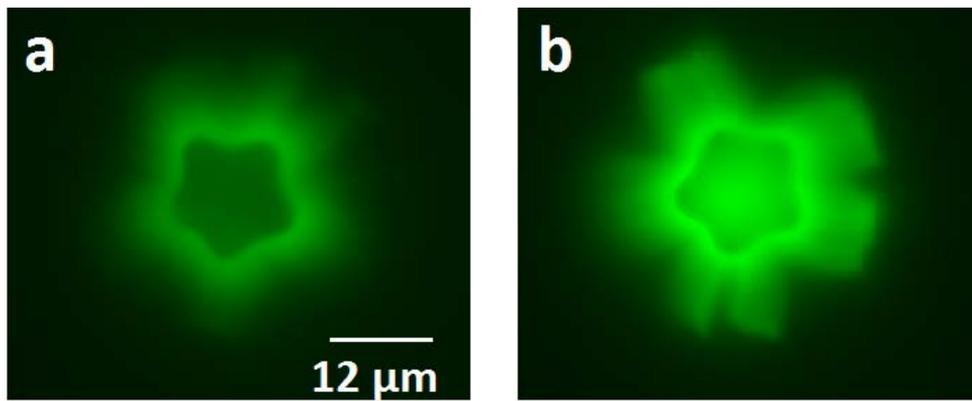


FIGURE 3.22 – Effet du photodamage. A gauche : un gel d'actine ayant poussé sur un colloïde et dont une image de fluorescence avec 100 ms de temps de pause a été prise au bout de 90 minutes de croissance. A droite : colloïde du même échantillon dont on a pris une image de fluorescence avec 100 ms de temps de pause toutes les 2 minutes pendant 90 minutes

d'intérêt considérée dans l'image de référence.

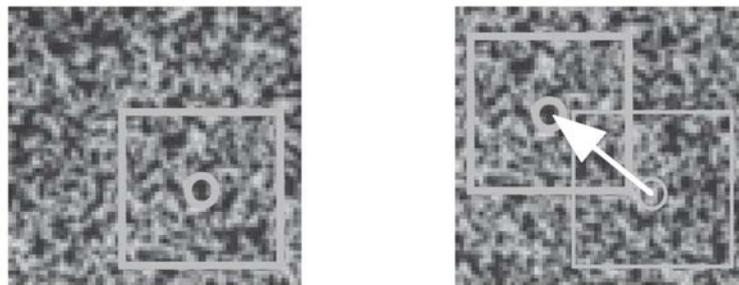


FIGURE 3.23 – Principe de la corrélation. Zones d'étude sur une image de référence (gauche) et sur une image déformée (droite)

La corrélation en principe :

On utilise la fonction de corrélation croisée (*xcorr2* sous *Matlab*), qui est un opérateur qui agit sur deux fonctions ($f(x,y)$, $g(x,y)$), correspondant chacune à une image. La fonction vaut 1 lorsque les deux images sont identiques et tend vers -1 quand les fonctions sont très différentes. L'algorithme recherche les valeurs des déplacements dx et de dy telles que $g(x+dx,y+dy)$ maximise l'opérateur de corrélation avec f . Ces valeurs sont retenues comme les meilleures estimations des déplacements de l'image g par rapport à l'image f .

La procédure adoptée dans cette thèse

Dans la pratique, l'algorithme calcule la fonction de corrélation entre une imagerie de référence, celle de la première image du film, et une imagerie des images suivantes. La corrélation telle que présentée ci-dessus n'étant précise qu'au pixel près, la méthode que nous avons choisi d'implémenter repose sur le principe de l'interpolation de la corrélation, qui peut donner une

sensibilité au 100^{ème} de pixel ([Bing et al., 2006]).

Choix d'une zone d'intérêt : Les images des films que nous analysons sont des matrices 2D dont les niveaux de gris sont codés sur 16 bits (valeur comprise entre 0 (noir) et $2^{16}-1$ (blanc)). Sur la première image du film, on définit une région d'intérêt (ROI) à l'intérieur de chaque cylindre dont nous désirons suivre le déplacement (voir image 3.24).

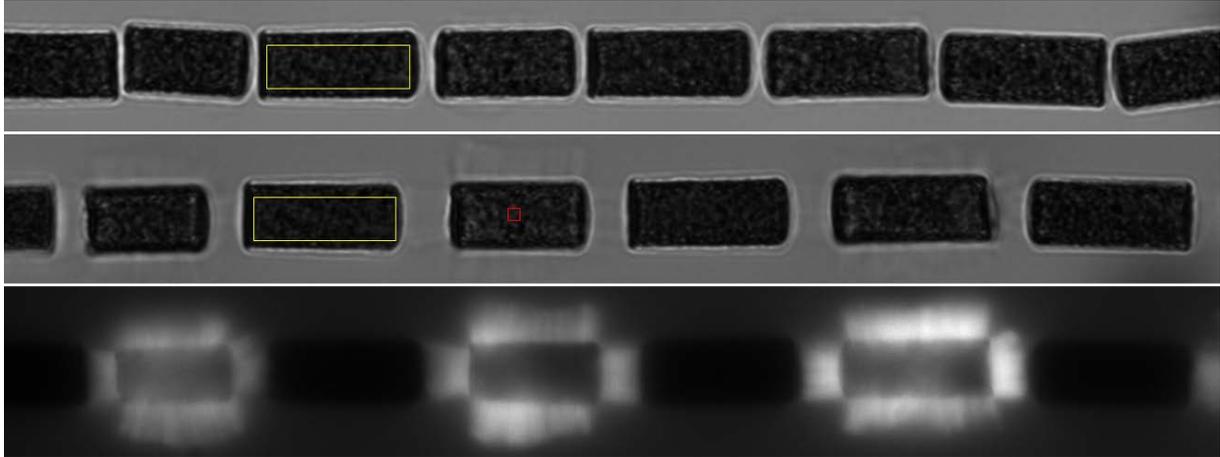


FIGURE 3.24 – Corrélation d'images. Haut : Chaîne à $t=0$ min, on voit que les cylindres sont séparés, ce qui est la signature de la présence d'un gel d'actine entre les deux. En jaune : la ROI à suivre pour un cylindre pour la corrélation. Milieu : La même chaîne après environ 5 minutes. On voit que les cylindres se sont déplacés, les gels ont poussés. Le carré rouge est agrandi en figure 3.25. En bas : image de fluorescence de la chaîne de cylindres, faisant apparaître les gels d'actine. Les cylindres de ces images font $6 \mu\text{m}$ de diamètre.



FIGURE 3.25 – Zoom de la partie rouge de l'image 3.24 montrant la granulosité des cylindres.

Corrélation : Cette zone est ensuite déplacée sur les images suivantes de manière à trouver la position de la meilleure corrélation possible. Pour cela, on définit une matrice de corrélation de dimensions 3×3 , et on déplace la ROI autour de sa position initiale d'un pixel horizontalement et d'un pixel verticalement de manière à balayer un espace de 3×3 pixels autour de la position de référence. Pour chaque position, la fonction de corrélation est calculée. Tant que le maximum de la corrélation n'est pas au centre du carré, on translate la position de référence en direction de la position du maximum de corrélation dans la matrice 3×3 , et on recommence le processus jusqu'à

ce que le maximum de corrélation soit au centre de la matrice. Plusieurs itérations peuvent donc être nécessaires pour trouver le bon déplacement.

Interpolation de la corrélation : Une fois cette nouvelle position déterminée, on fait ensuite une interpolation de la corrélation autour de ce point, sur une matrice de 200×200 pixels. On utilise ici une équation bicubique pour modéliser localement la matrice de corrélation.¹ La surface interpolée est alors plus régulière que celles obtenues par une interpolation bi-linéaire ou par l'interpolation au plus proche voisin, mais demande en général plus de temps de calcul. Pour ce faire, on utilise la fonction *interp2* de Matlab.

On note alors la position du maximum de cette interpolation, et ensuite le déplacement relatif par rapport à la première image.

Score de corrélation : Lorsque le score de corrélation devient trop faible ($< 0,9$) après plusieurs images pour cause de changement de focus par exemple, le programme reprend automatiquement comme nouvelle image de référence la dernière pour laquelle le score de corrélation était supérieur à $0,9$, et la dernière position enregistrée.

La résolution sur la position est très bonne car les techniques de corrélation fonctionnent très bien pour plusieurs raisons : les objets sont grands (typiquement plusieurs centaines de pixels), les colloïdes qu'ils contiennent donnent une granularité aux images qui est très favorable aux techniques de corrélation d'images, et la dynamique en niveau de gris de la caméra est grande (16 bits).

3.6.2 Détermination des contours des cylindres

La corrélation ne donne que les déplacements relatifs des cylindres et non leur position absolue. Or nous en avons besoin pour connaître précisément la distance entre les cylindres, et ainsi mesurer la taille du gel et calculer la force appliquée. Pour obtenir la distance absolue, nous mesurons à la main, sous ImageJ, la distance bord à bord entre deux cylindres sur l'image de référence. On a ensuite accès aux autres distances absolues par le déplacement relatif des cylindres obtenu avec le programme de corrélation.

Détection de bords

Incertitude sur la position des bords des cylindres : La mesure de distance "à la main" comporte une incertitude, car la position exacte des bords des cylindres n'est pas facile à déterminer. On peut voir sur l'image 3.26 en bas le profil d'intensité de la courbe jaune tracée sur le cylindre au-dessus. Les bords des cylindres ne présentent pas un saut net (le saut se fait sur une dizaine de pixels), qui ne permet pas de les déterminer précisément. Pour chaque mesure, il y a une erreur systématique et un écart type qu'il convient de déterminer et qui dépend de

1. En mathématiques, l'interpolation bicubique est une extension de l'interpolation cubique à deux dimensions.

l'opérateur.

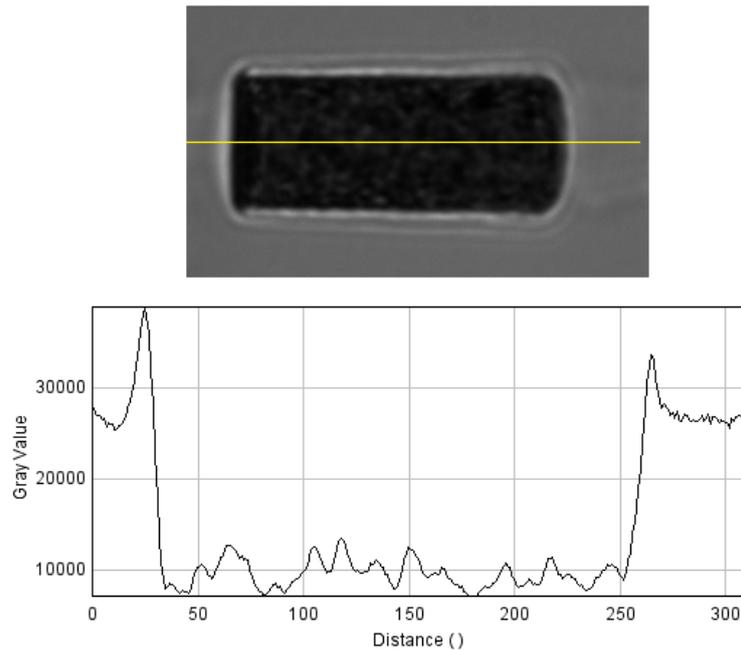


FIGURE 3.26 – Estimation des bords d'un cylindre. En haut, cylindre de $6 \mu\text{m}$ de diamètre. En bas, profil d'intensité le long de la ligne jaune sur l'image du haut.

Utilisation de billes pour déterminer la position du bord d'un cylindre : Afin d'évaluer l'erreur de mesure, l'idée est d'utiliser des billes MyOne de diamètre $1.1 \mu\text{m}$ très monodisperses, dont on peut détecter le centre avec une bonne précision, et qui sous champ magnétique vont s'auto-organiser en chaînes entre elles et avec les cylindres. Connaissant précisément le diamètre d'une bille MyOnes ainsi que sa position on est capable de déduire la position exacte du bord du cylindre comme étant à un rayon du centre de la bille (voir figure 3.27 et 3.28).

L'expérimentateur note la position du bord qu'il aurait prise sans l'information donnée par la bille. En faisant cet exercice sur quelques dizaines d'images, on connaît alors l'erreur absolue commise par un expérimentateur, ainsi que son écart type. On en tient alors compte dans les calculs de distance dans le programme de corrélation, ainsi que dans les calculs de forces appliquées entre deux cylindres sous champ magnétique.

Forme des cylindres : Lors de la fabrication des colloïdes superparamagnétiques, le remplissage des moules de PDMS avec la solution est régit par les propriétés de mouillage de la solution, qui créent un ménisque dans les puits, ce qui produit un creux sur une des faces des cylindres. La détermination de la courbure de la surface des cylindres est décrite en annexe C.

Résultats : Pour cette série de mesures, nous avons réalisé 23 mesures pour le côté bombé, et 17 pour le côté creux. L'erreur moyenne pour le côté bombé est de 4.1674 pixels vers l'intérieur



FIGURE 3.27 – Schéma de principe de l'expérience d'estimation des bords d'un cylindre. Les billes noires représentent des billes MyOnes de $1.1 \mu\text{m}$ de diamètre, le rond blanc correspond à leur centre connu très précisément en faisant le focus sur le haut des billes et en prenant le barycentre des pixels pondéré par leur intensité. Ceci permet d'en déduire la position exacte du bord du cylindre.

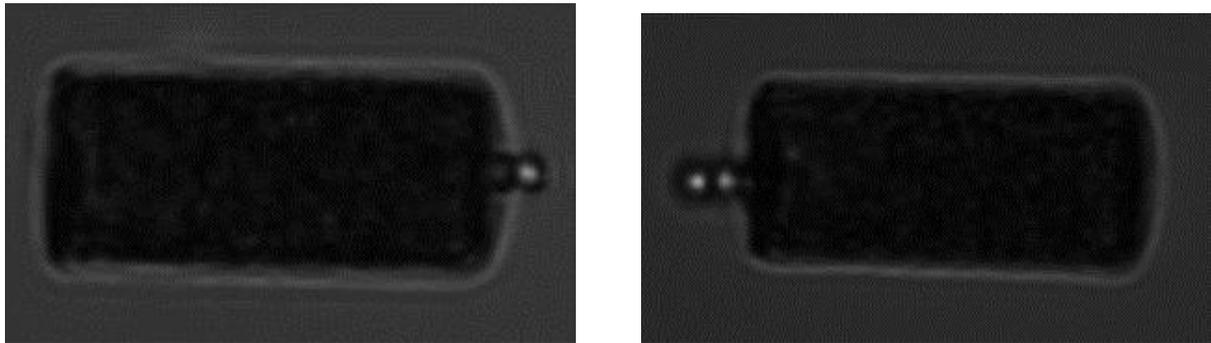


FIGURE 3.28 – Images en fond clair des expériences de détermination des bords des cylindres avec des billes MyOnes de $1.1 \mu\text{m}$. La connaissance de la position exacte du centre de la bille permet d'en déduire la position exacte du bord du cylindre. A gauche : La bille est contre le côté bombé du cylindre. A droite : La bille est contre le côté creux.

du cylindre, avec un écart type de 2.0807 pixels, et l'erreur moyenne pour le côté creux est de 3.5147 pixels, avec un écart type de 1.8296 pixels.

Côté bombé et côté creux n'ont pas les mêmes moyennes, mais au vu de l'écart type ils ne sont pas significativement différents. En combinant les deux, l'erreur moyenne ainsi obtenue pour les deux côtés est de 3.8900 pixels vers l'intérieur du cylindre, avec un écart type de 1.9804 pixels.

Précision de la mesure : L'estimation sur l'erreur de la mesure est de $1.98 \times \sqrt{2} = 2.8001$ px (les erreurs étant indépendantes, l'erreur totale est leur somme quadratique), ce qui donne $1.98 \times \sqrt{2} / 15.8 = 0.1772 \mu\text{m}$ (avec 15.8 pixels = $1 \mu\text{m}$ à l'objectif $\times 100$). C'est la précision de notre mesure absolue. Il est à noter toutefois que la précision sur la mesure du déplacement relatif des cylindres est bien meilleure grâce à la corrélation subpixels.

Conclusion

Nous avons développé un nouveau dispositif expérimental basé sur l'auto organisation de cylindres superparamagnétiques pour étudier les propriétés des gels d'actine branchés reconstitués

in vitro. Pour cela, nous avons développé une nouvelle méthode de fabrication de microparticules magnétiques de taille, de géométrie, et de contenu magnétique contrôlés, dont la collecte est facile, et sommes capables de quantifier la force exercée entre deux cylindres sous un champ magnétique extérieur. Nous sommes capables de reconstituer des gels d'actine branchés sur la surface de ces cylindres, et de faire varier les concentrations des protéines pour modifier l'architecture des gels. Le dispositif expérimental permet d'appliquer un champ magnétique connu dans le temps, et de suivre le déplacement des cylindres (et donc l'épaisseur d'un gel d'actine) au cours du temps.

Ainsi nous pouvons étudier la mécanique et les processus de génération de force de ces gels, et ceci avec un haut débit de mesures, ce qui permet d'obtenir de bonnes statistiques et de faire des mesures systématiques en faisant varier les concentrations des différentes protéines.

Chapitre 4

Résultats

Sommaire

4.1	Auto-organisation des cylindres et croissance des gels	90
4.1.1	Alignement des cylindres	90
4.1.2	Aspect des gels	90
4.1.3	Évolution de la densité des gels en fonction de la concentration en Arp2/3	91
4.2	Premières mesures	93
4.2.1	Rampes de forces et mesures de mécanique non-linéaire	93
4.2.2	Croissance à champ magnétique constant	93
4.3	Mesure intégrée de la vitesse de croissance et de la mécanique	95
4.3.1	Champ magnétique exercé	96
4.3.2	Suivi de l'épaisseur d'un gel au cours du temps	97
4.4	Mécanique des réseaux d'actine	98
4.4.1	Extraction des données de mécanique	98
4.4.2	Caractérisation du module élastique des gels pour une concentration en Arp2/3 fixée à 100 nM	99
4.4.3	Évolution du module d'Young en fonction de la concentration en Arp2/3	102
4.5	Croissance de gels sous contrainte	103
4.5.1	Extraction des données de vitesse	103
4.5.2	Caractérisation à $[\text{Arp2/3}] = 100 \text{ nM}$	104
4.5.3	Caractérisation à $[\text{Arp2/3}] < 30 \text{ nM}$	104
4.6	Effet des itérations sur les propriétés des gels	105
4.6.1	Itérations à l'échelle d'un gel	106
4.6.2	Évolution des gels en fonction des itérations successives pour différentes concentrations en Arp2/3	107
4.7	Relation entre mécanique et vitesse	110
4.8	Ce qu'il reste à faire	112

Ce chapitre est consacré aux résultats obtenus quant à la croissance sous contrainte et à la mécanique des réseaux d'actine. Nous verrons tout d'abord les résultats initiaux ayant permis de développer par la suite des mesures plus complexes (sections 4.1 et 4.2). Nous introduirons ensuite une mesure typique (section 4.3). Puis nous verrons les résultats concernant les mesures

mécaniques (section 4.4), les mesures force-vitesse (section 4.5), et l'évolution des propriétés des gels au cours des expériences (section 4.6). Enfin, nous ferons le lien entre les propriétés mécaniques des gels et leurs vitesses de croissance (section 4.7). La dernière section (4.8) sera consacrée aux travaux supplémentaires qui permettraient d'approfondir la compréhension des phénomènes étudiés lors de cette thèse.

4.1 Auto-organisation des cylindres et croissance des gels

4.1.1 Alignement des cylindres

Les cylindres superparamagnétiques s'auto-organisent sous champ magnétique en chaînes selon leur plus grand axe (voir figure 4.1). Ils sont alignés dans la même direction que le champ magnétique, et leurs surfaces sont bien face à face avec leurs axes bien alignés (un décalage de l'axe des cylindres est énergétiquement défavorable).

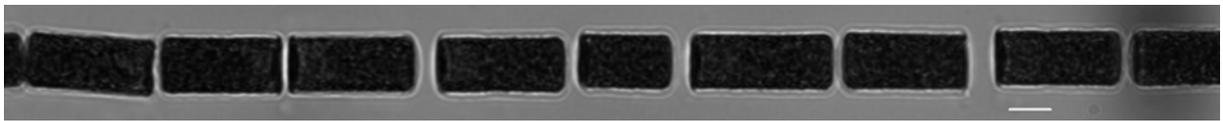


FIGURE 4.1 – Alignement des cylindres sous un champ magnétique horizontal. La barre d'échelle fait $5 \mu\text{m}$.

Ce premier résultat valide la méthode que nous avons adoptée dans cette thèse consistant à faire pousser des gels d'actine entre deux cylindres. Les cylindres n'étant pas décalés, les gels sont contraints sur toute la surface de leur front avant. On n'a ainsi pas besoin de faire pousser des gels face à un mur magnétique comme nous en avons l'intention dans une version préliminaire de cette expérience.

4.1.2 Aspect des gels

Les gels que nous obtenons à la surface des cylindres sont très différents de ceux obtenus à partir d'une surface sphérique. Ils poussent sur toutes les faces, et on observe une brisure qui fait que les gels poussant à partir des faces planes sont droits et très probablement non contraints, en tout cas beaucoup moins que dans le cas des surfaces sphériques (voir image 4.2). Le gel brise sur les arêtes des cylindres, là où le rayon de courbure est très faible (les colloïdes incorporés dans l'ETPTA ont un diamètre de 300 nm), probablement à cause de la contrainte interne trop forte qui s'y trouve. Sur des billes de quelques μm de diamètre ([van der Gucht et al., 2005, Achard et al., 2010]), les gels brisent également au bout d'une certaine épaisseur à cause de la contrainte trop forte présente dans les gels.

Ces observations confirment que cette expérience permet de réaliser des mesures mécaniques directes, ainsi que des mesures de vitesse de croissance des gels sous une contrainte axiale connue et contrôlée, suffisamment facilement pour en faire beaucoup. Puisque les gels poussent droit avec la méthode de fonctionnalisation totale des cylindres (image de gauche), on a choisi cette méthode plutôt que celle consistant à ne fonctionnaliser qu'une face (image de droite) qui est



FIGURE 4.2 – Aspect d’un gel d’actine poussant sur un cylindre superparamagnétique de $6\ \mu\text{m}$ de diamètre. Gauche : cylindre fonctionnalisé sur toutes les faces. Droite : cylindre fonctionnalisé sur une seule face.

moins reproductible car plus difficile à mettre en oeuvre (cf section 3.3.1).

Nous avons également effectué des expériences préliminaires en ajoutant de l’ α -actinine qui est un réticulant des filaments d’actine. On voit sur la figure 4.3 que les gels ne brisent pas sur les arêtes. Ceci montre qualitativement que les propriétés mécaniques des gels branchés et réticulés sont différentes de celles des gels simplement branchés.

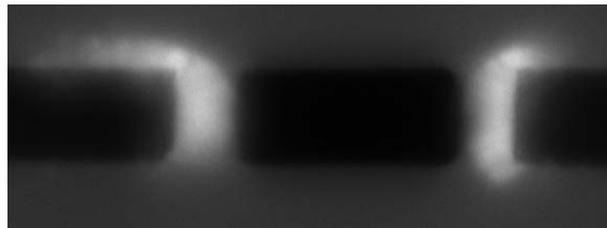


FIGURE 4.3 – Aspect des gels lorsqu’on rajoute de l’ α -actinine. On ne voit pas de brisure des gels sur les coins contrairement aux images de la figure 4.2. Les cylindres font $6\ \mu\text{m}$ de diamètre.

4.1.3 Évolution de la densité des gels en fonction de la concentration en Arp2/3

Une des forces de notre système expérimental est de pouvoir faire un grand nombre de mesures, et ainsi de pouvoir faire des mesures systématiques en faisant varier l’architecture des gels en changeant les concentrations des protéines d’architectures telles que Arp2/3 ou gelsoline. Pour rappel, une augmentation de la concentration en Arp2/3 augmente la densité de branchements, et une augmentation de la concentration en gelsoline diminue la longueur des branches en coiffant les filaments, et donc affecte également la connectivité moyenne, le degré d’enchevêtrement ou la distance entre branches. Dans notre cas, nous avons réalisé des expériences pour différentes concentrations en Arp2/3 (10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM, 180 nM), à une concentration en gelsoline fixée à 90 nM.

Afin de connaître la densité en actine des gels, nous avons pris une image de fluorescence de chaque gel sondé. L’intensité de fluorescence des gels est liée à la densité d’actine. Un des premiers résultats concerne l’observation de l’évolution de la densité de fluorescence des gels en

fonction de la concentration en Arp2/3 (voir figure 4.4). On voit que la concentration en actine dans les gels (liée à la densité de fluorescence) augmente avec la concentration en Arp2/3 jusqu'à atteindre un plateau vers $[\text{Arp2/3}] = 100 \text{ nM}$. Ce résultat est différent de l'observation qui avait été faite sur les billes dans [Pujol et al., 2012] où il n'y avait pas de variation du niveau de fluorescence des gels en fonction de la concentration en Arp2/3. Ceci était probablement dû aux contraintes internes qui se développent dans un gel sphérique, soit que ces contraintes modifient la croissance du gel, soit que le gel soit comprimé et densifié par ces contraintes. L'architecture de ces gels à différentes concentrations en Arp2/3 était cependant différente, comme montré par la forte variation de module élastique (cf section 2.2.4).

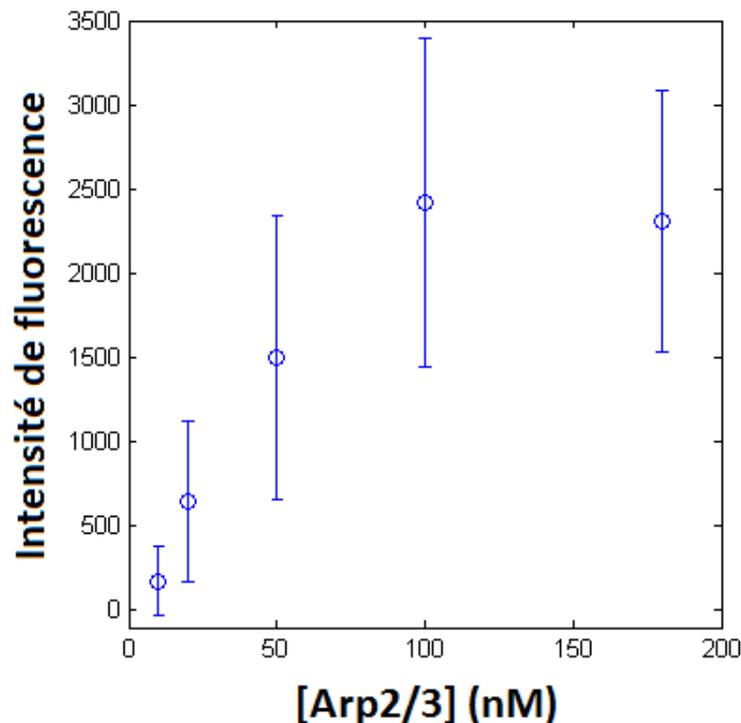


FIGURE 4.4 – Evolution de la densité de fluorescence des gels d'actine en fonction de la concentration en Arp2/3. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Dans le cas des gels poussant sur des cylindres, les gels se densifient avec l'augmentation de la concentration en Arp2/3 jusqu'à un plateau. On peut supposer que les gels ont alors une architecture microscopique différente, ou qu'ils atteignent une saturation biochimique, qui fait que l'augmentation de la concentration en Arp2/3 dans la solution n'affecte plus l'architecture des gels.

Variabilité : On observe sur la figure 4.4 qu'il y a une certaine variabilité de l'intensité de fluorescence (probablement due à des variations dans la densité de VCA et à la nature de la polymérisation depuis une surface). Lorsque deux gels se font face, leur densité peut être assez différente et la réponse mesurée est la combinaison de celles de deux gels hétérogènes. Pour simplifier les analyses nous nous sommes donc limités aux résultats concernant des liaisons "simples",

c'est à dire des gels étant compressées contre un cylindre dont la surface a été passivée en BSA. En effet, dans les expériences, de nombreuses liaisons "doubles" (deux gels d'actine l'un contre l'autre, figure 4.5) sont également sondées, mais nous ne les avons pas analysées.

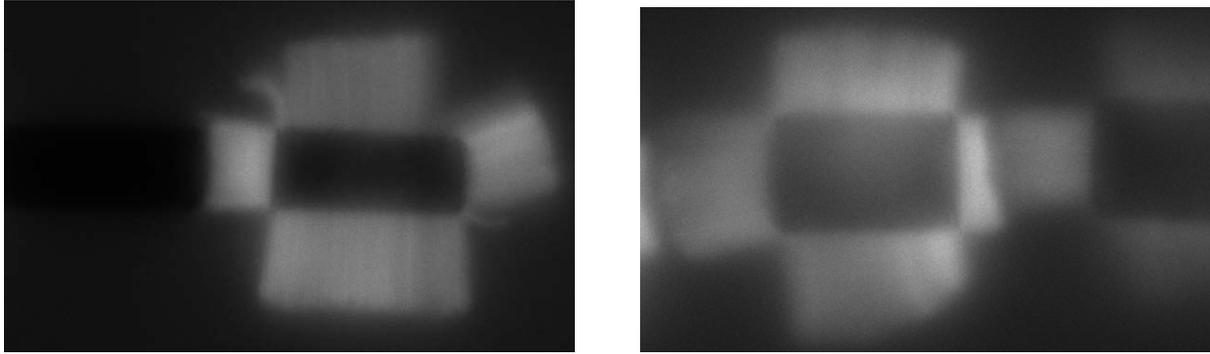


FIGURE 4.5 – Images de fluorescence des gels d'actine. Gauche : une liaison simple. Droite : une liaison double. Les cylindres font ici 6 μm de diamètre.

4.2 Premières mesures

4.2.1 Rampes de forces et mesures de mécanique non-linéaire

Pour sonder la mécanique des gels d'actine, nous avons effectué des rampes de forces sur les gels poussant à partir de la surface des cylindres. On mesure l'épaisseur des gels à partir de la distance bord à bord des cylindres dont on suit l'évolution par la méthode de corrélation. Contrairement aux billes, la surface de contact entre deux surfaces planes est constante lors de la compression, et on déduit directement la déformation en fonction de la contrainte appliquée sur les gels. On obtient alors des résultats comme ceux présentés sur la figure 4.6.

On remarque qu'il y a une très faible hystérésis sur ces courbes, et qu'elles ne sont pas linéaires. Pour calculer le module différentiel ($K = \frac{d\sigma}{d\epsilon}$, avec K le module différentiel, σ la contrainte et ϵ la déformation), on trace des fits linéaires de petites portions des courbes contrainte-déformation des gels (voir figure 4.7 à gauche). On voit qu'il varie avec la contrainte qui est appliquée sur les gels d'actine, avec une rigidification sous contrainte. Cette dépendance de K à σ est le signe d'une élasticité non-linéaire (figure 4.7 à droite). Ce phénomène a déjà été observé dans les expériences décrites en section 2.2.4. Cette non-linéarité n'avait pas été observée chez [Pujol et al., 2012] à cause probablement des contraintes internes dues à la géométrie sphérique.

4.2.2 Croissance à champ magnétique constant

Quand on laisse un gel croître sous force la croissance écarte les cylindres et s'oppose à la force magnétique (cf figure 4.8).

Pour étudier la croissance des gels sous contrainte axiale, nous avons mesuré la vitesse d'écartement de deux cylindres entre lesquels pousse un gel d'actine avec un champ magnétique constant (30 mT). La première chose que l'on observe est que les gels poussent sous force,

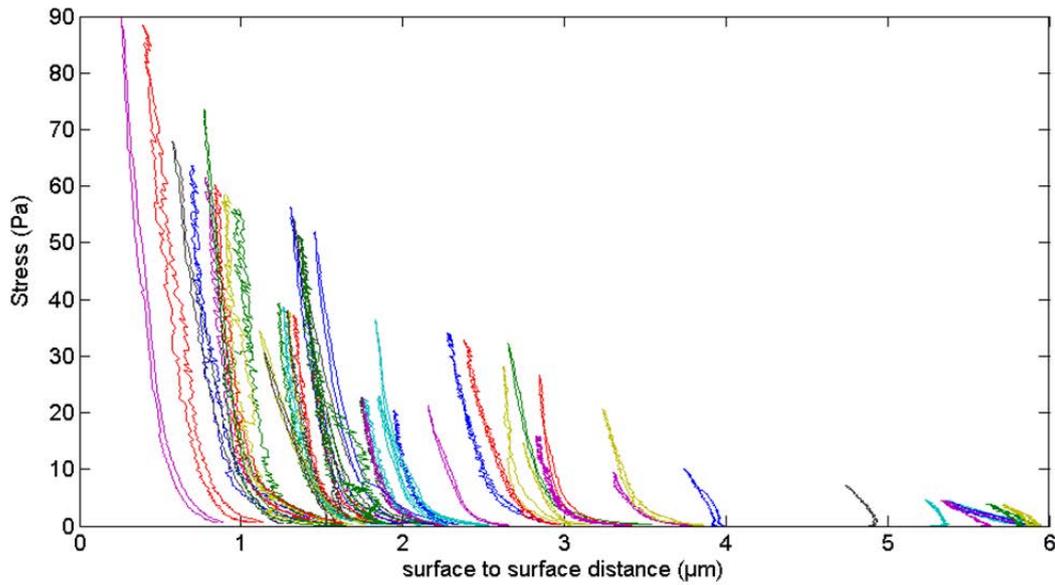


FIGURE 4.6 – Courbes d'évolution de la contrainte en fonction de l'épaisseur des gels lors d'une rampe de force pour différents gels.

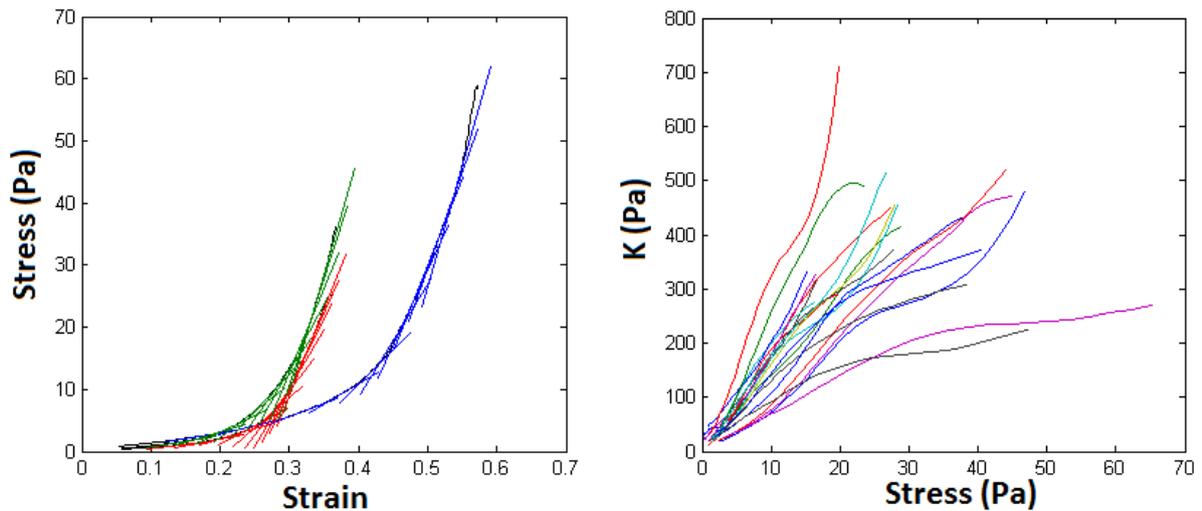


FIGURE 4.7 – Gauche : Fits linéaires de quelques courbes contrainte - déformation permettant de calculer le module différentiel des gels. Droite : Évolution du module différentiel des gels en fonction de la contrainte appliquée.

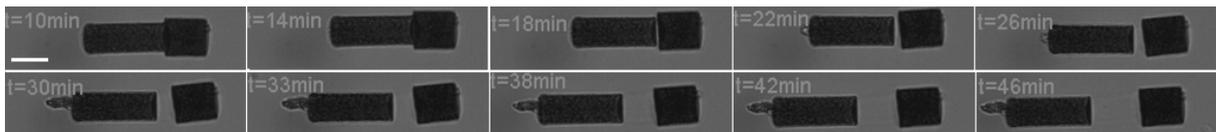


FIGURE 4.8 – Croissance d'un gel sous force. On voit que l'épaisseur augmente au cours du temps, et que les cylindres s'écartent. La barre d'échelle fait $6 \mu\text{m}$.

et que leur vitesse de croissance augmente au cours du temps (figure 4.9). Ceci est attendu par le fait que la contrainte appliquée sur le gel diminue au cours du temps, car les cylindres s'écartent

et que la force diminue avec la distance (à 30 mT, la force passe de 1.77 nN pour une distance de $1 \mu\text{m}$ à 0.1 nN pour une distance de $10 \mu\text{m}$). On a tracé sur la figure 4.9 en bas l'évolution de la vitesse de croissance du gel en fonction de la contrainte appliquée. On voit que plus la contrainte est forte, plus la vitesse diminue.

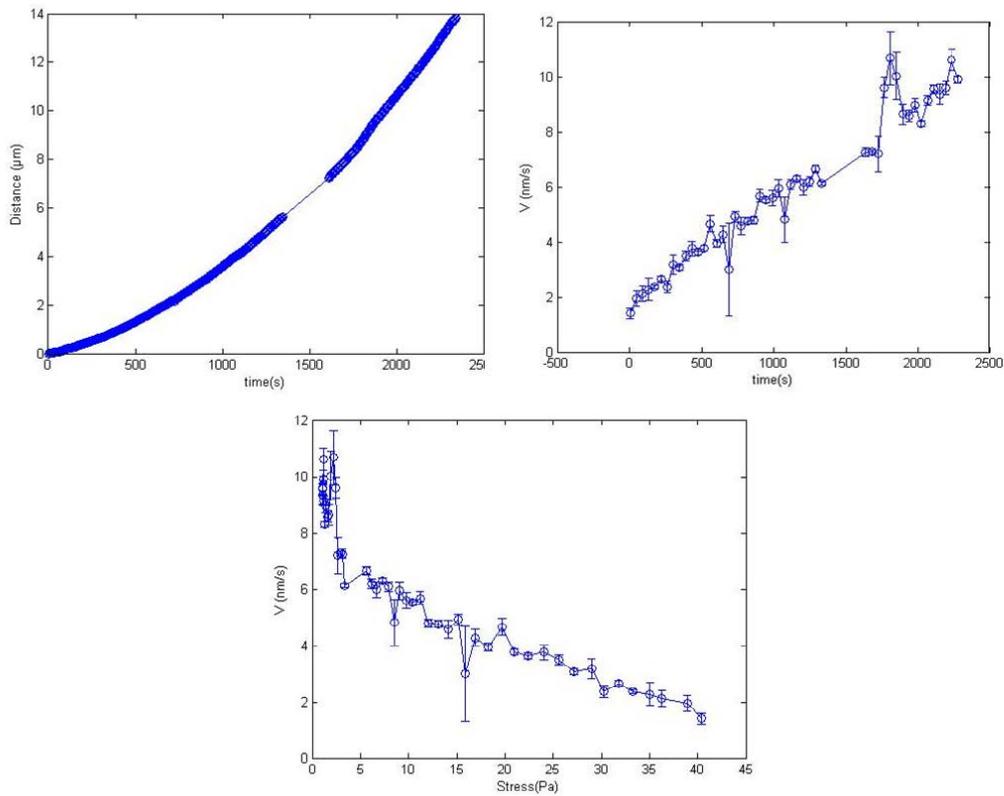


FIGURE 4.9 – En haut : Gauche : Évolution de l'épaisseur d'un gel d'actine poussant sous force au cours du temps. Droite : Évolution de la vitesse de croissance du gel au cours du temps. En bas : Évolution de la vitesse de croissance du gel en fonction de la contrainte appliquée.

Cependant lorsqu'on reproduit l'expérience avec un champ faible (3 mT), la force est très faible (la force passe de 1.8 pN pour une distance de $1 \mu\text{m}$ à 0.1 pN pour une distance de $10 \mu\text{m}$), mais on observe aussi une variation de la vitesse en fonction du temps (figure 4.10). Ainsi, si on veut observer l'effet de la contrainte appliquée sur la polymérisation, on ne peut pas se contenter de maintenir un champ constant pour étudier la vitesse de croissance en fonction de la contrainte, mais il est nécessaire d'appliquer la même contrainte à des moments différents.

4.3 Mesure intégrée de la vitesse de croissance et de la mécanique

Pour s'affranchir du fait que la vitesse de croissance des gels n'est pas constante au cours du temps, nous faisons varier le champ magnétique au cours de la croissance des gels. Nous voulons obtenir en une seule mesure des informations sur la polymérisation sous contrainte et sur la mécanique des réseaux d'actine reconstitués sur la surface des cylindres. Le montage expérimental

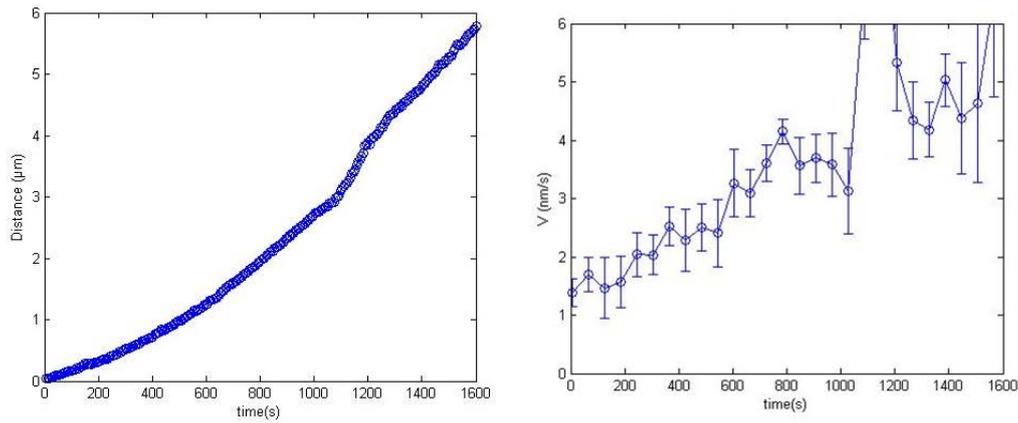


FIGURE 4.10 – Gauche : Évolution de l'épaisseur d'un gel d'actine poussant à faible contrainte ($B=3$ mT) au cours du temps. Droite : Évolution de la vitesse de croissance du gel au cours du temps.

tal décrit au chapitre précédent permet de réaliser ce critère en paramétrant les sollicitations magnétiques à effectuer.

4.3.1 Champ magnétique exercé

Pour faire des mesures de croissance sous contrainte axiale, nous mesurons la croissance d'un gel pendant quelques secondes à force magnétique constante. Pour cela nous appliquons des paliers de champ magnétique de 20 secondes pour différentes valeurs (3 mT, 10 mT, 20 mT, 40 mT, 60 mT, 80 mT) afin d'appliquer plusieurs forces différentes.

Pour faire des mesures mécaniques, nous sollicitons les gels de manière dynamique en compression afin de déterminer leur module d'Young en utilisant la loi de Hooke. Pour cela, les changements de paliers de champ magnétique sont effectués par des rampes de quelques secondes, sur lesquelles nous pouvons ensuite mesurer la déformation des gels. Les compressions rapides permettent de sonder directement l'élasticité des gels, et de s'affranchir de sa croissance ainsi que des effets de réorganisation du gel aux temps longs.

Ces deux types de mesures sont faites de manière conjointe, en paramétrant une sollicitation typique en champ magnétique reproduite en figure 4.11. On y observe les paliers et les rampes de champ magnétique. Une telle sollicitation est réalisée plusieurs fois sur un même gel. Le gel polymérisant au cours du temps, son épaisseur augmente et les cylindres s'écartent. Ainsi, pour un même champ magnétique appliqué, la force résultante exercée sur le gel ne sera pas la même d'une sollicitation à l'autre. Ceci permet d'obtenir des mesures de vitesses pour différentes valeurs de forces et de reconstituer une courbe force-vitesse en plusieurs étapes. En répétant plusieurs fois ces sollicitations, nous pouvons ainsi observer des effets de l'histoire ou du vieillissement du gel.

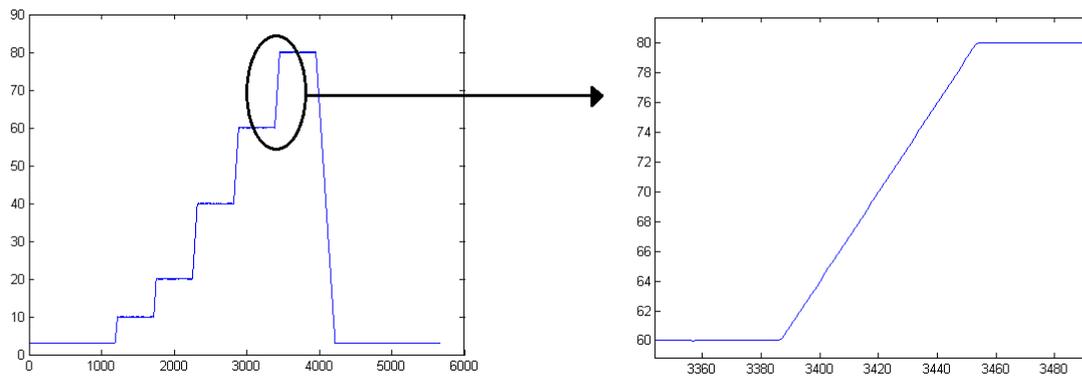


FIGURE 4.11 – Champ magnétique généré. Abscisse : numéro de l'image, avec une image toutes les 30 ms. Ordonnées : Valeur du champ magnétique appliqué en mT. Gauche : Une sollicitation typique, avec des paliers à 3 mT, 10 mT, 20 mT, 40 mT, 60 mT, 80 mT, puis de nouveau à 3 mT. Droite : Zoom sur une rampe entre deux paliers, durant deux secondes.

4.3.2 Suivi de l'épaisseur d'un gel au cours du temps

Résultat général

Le suivi d'un gel au cours des différentes sollicitations en champ magnétique (comme en figure 4.11), après traitement des données par corrélation d'images comme vu au chapitre précédent, donne des courbes comme celles obtenues en figure 4.12, où on observe l'épaisseur d'un gel (en μm) en fonction du temps. On voit que l'épaisseur du gel diminue au moment des rampes lorsque la contrainte augmente. On voit également que la vitesse de croissance du gel (qui correspond à la pente des portions de droites à champ magnétique constant) diminue quand le champ magnétique appliqué augmente. Le gel ne paraît pas endommagé et garde ses propriétés élastiques puisqu'il retrouve ensuite sa taille initiale lorsque le champ magnétique est relâché. Ce phénomène est reproductible, ce que l'on peut voir sur les portions de courbes suivantes. C'est de ces courbes, et de la connaissance de la valeur du champ magnétique au cours du temps, que nous pouvons extraire toutes les données suivantes.

Des comportements semblant indiquer une transition

Lors des sollicitations successives, certains gels semblent voir leur propriétés mécaniques changer. Nous avons représenté sur la figure 4.13 l'évolution de l'épaisseur d'un gel polymérisé à partir d'une concentration en Arp2/3 de 10 nM lors de trois sollicitations successives. On voit un changement brutal de l'épaisseur lors de la deuxième sollicitation, et le gel est fortement comprimé (vers $t=340$ secondes). Le comportement du gel lors de la troisième itération est très différent de celui lors de la première itération. La déformation lors des rampes est beaucoup plus faible sur les premières sollicitations que sur les sollicitations finales. La vitesse de polymérisation sous contrainte chute également après cette transition. Ces résultats qualitatifs semblent montrer que certains gels transitent d'un état "dur" vers un état "mou" pendant l'expérience. Ces transitions dépendent de la concentration en Arp2/3. Nous donnerons des résultats plus quantitatifs dans les prochaines sections.

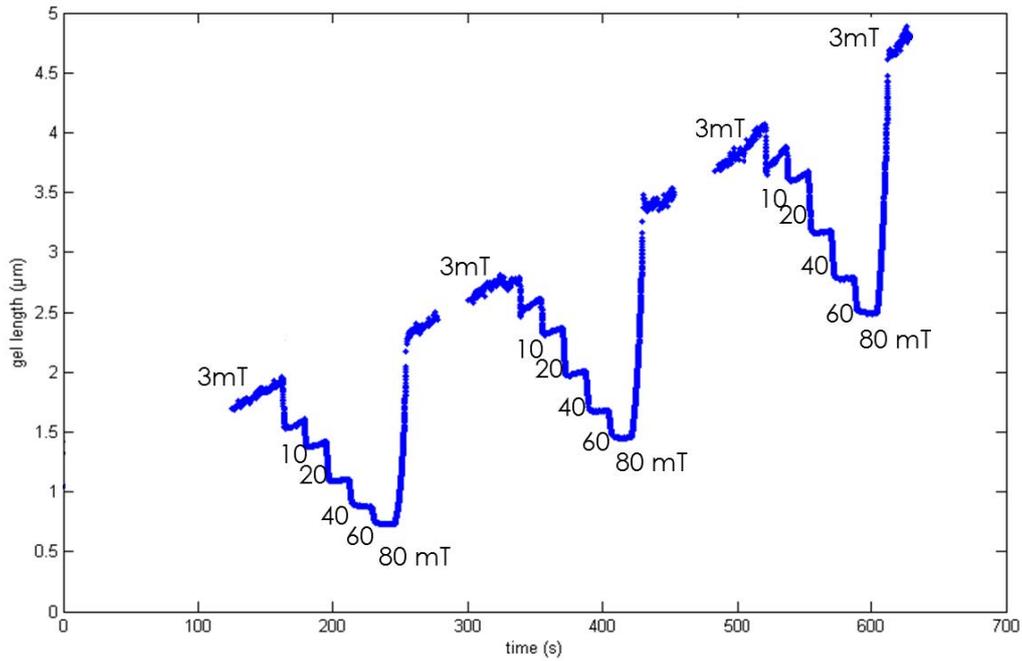


FIGURE 4.12 – Croissance d'un gel d'actine sous force. Les valeurs indiquées correspondent au champ magnétique extérieur appliqué.

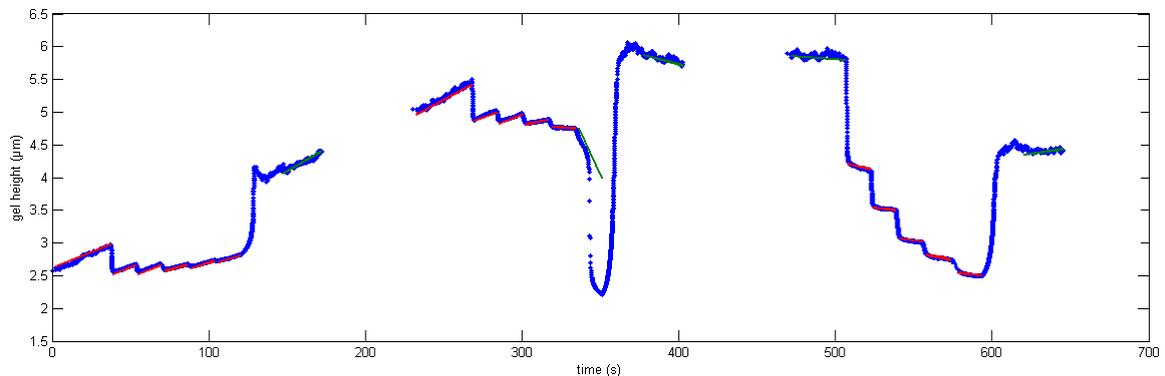


FIGURE 4.13 – Transition mécanique d'un gel au cours du temps. $[\text{Arp}2/3]=10 \text{ nM}$.

4.4 Mécanique des réseaux d'actine

4.4.1 Extraction des données de mécanique

La courbe 4.12 permet d'obtenir des informations quant à la mécanique des réseaux d'actine branchés. En effet, les différentes rampes de champ magnétique entre chaque palier, et donc de force, permettent de compresser les gels sur des intervalles de temps très courts ($\sim 2 \text{ s}$) et de sonder leur élasticité autour d'une précontrainte qui est caractérisée par le module différentiel (cf section 4.2.1). On obtient ainsi une valeur de module par rampe de force. Comme on applique plusieurs rampes par acquisition, et qu'un gel est sollicité plusieurs fois, on balaye une large gamme de contraintes. La courbe 4.14 représente l'évolution du module d'Young d'un gel

d'actine en fonction de la contrainte appliquée pour un gel n'ayant pas transité. C'est un résultat typique que nous obtenons pour chaque gel sondé.

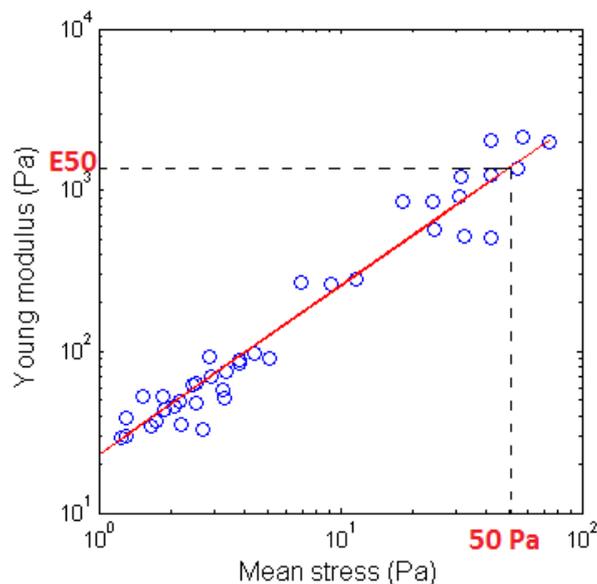


FIGURE 4.14 – Évolution du module élastique en fonction de la contrainte appliquée. $[\text{Arp}2/3]=30$ nM. Du fit linéaire de $\log(E)$ en fonction de $\log(\sigma)$ on obtient E50, le module d'Young à 50 Pa de contrainte.

A faible contrainte (< 10 Pa), [Chaudhuri et al., 2007] observe un régime d'élasticité linéaire, dans lequel E ne dépend pas de σ . Nous ne voyons pas ce régime dans nos expériences. Cela peut provenir du fait que les milieux de protéines ne sont pas les mêmes. En effet, [Chaudhuri et al., 2007] utilise un extrait d'oeuf de Xenope qui contient des crosslinkers. Nous n'en avons pas dans notre mélange de protéines purifiées. L'élasticité observée provient de l'effet collectif des enchevêtrements des branches entre-elles.

Cette courbe montre une forte non-linéarité des gels d'actine denses et branchés avec une rigidification sous contrainte. Le module passe de 200 Pa pour 1 Pa de contrainte à 2 kPa pour 80 Pa de contrainte. On ne voit cependant pas d'amollissement réversible sous contrainte comme observé dans [Chaudhuri et al., 2007]. La raison pourrait être que nous n'appliquons pas une contrainte suffisamment élevée pour observer ce phénomène (nos contraintes dépassent rarement 100 Pa pour un amollissement aux alentours de 300 Pa dans [Chaudhuri et al., 2007]).

De cette courbe, on peut également extraire le module du gel lorsqu'il subit une contrainte de 50 Pa. Cette grandeur caractéristique des gels sera utilisée par la suite.

4.4.2 Caractérisation du module élastique des gels pour une concentration en Arp2/3 fixée à 100 nM

On peut étudier l'évolution du module d'Young des gels en fonction de la contrainte appliquée avec de grandes statistiques sur une concentration donnée. Nous allons détailler les résultats

obtenus pour un ensemble de gels à une concentration en Arp2/3 de 100 nM où il n'y a pas de transition.

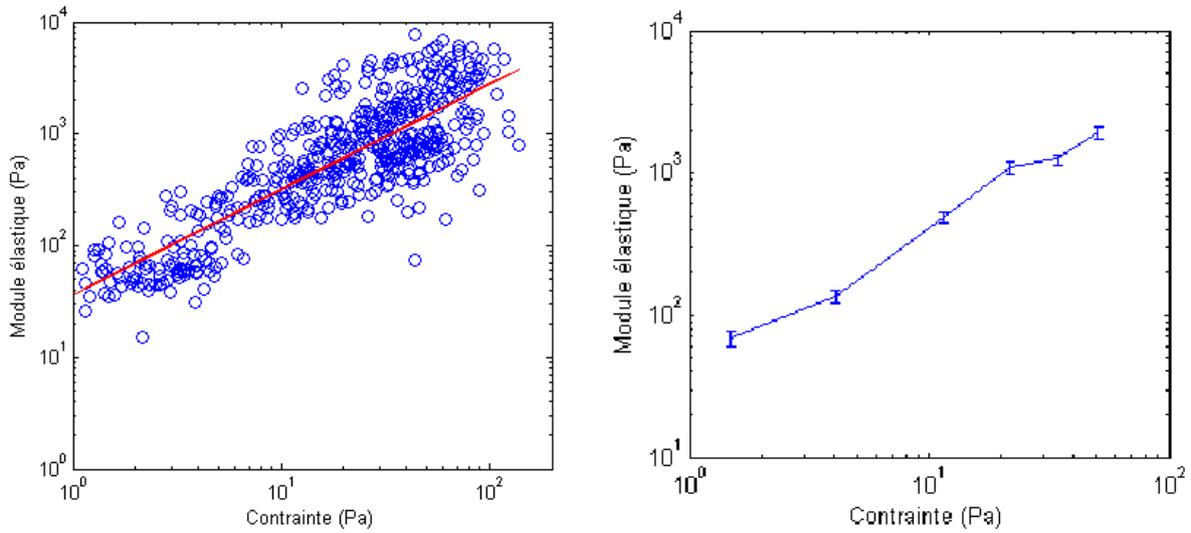


FIGURE 4.15 – Gauche : Évolution du module élastique en fonction de la contrainte appliquée pour 24 gels à $[\text{Arp2/3}] = 100$ nM. Droite : Les mêmes données sont représentées en faisant des moyennes par groupes (l'échantillon a été divisé en six groupes). Les barres d'erreur sont les erreurs types.

Sur la figure 4.15 nous avons tracé l'évolution du module d'Young en fonction de la contrainte appliquée pour un ensemble de gels ayant polymérisé avec une concentration en Arp2/3 de 100 nM. La courbe de droite représente ces mêmes valeurs en faisant des moyennes par groupes de points. Les données sont bruitées mais on voit sur les moyennes la force de faire beaucoup de mesures. On confirme aussi sur ces gels la rigidification sous contrainte et l'absence de régime linéaire à faibles contraintes observées précédemment. La pente de la courbe log/log est de 0.94 (et $R^2 = 0.71$). Nous avons tracé ces figures pour différentes concentrations en Arp2/3 en annexe D.

Sur la figure 4.16 nous avons tracé l'évolution du module d'Young à 50 Pa des gels en fonction de $\frac{h}{a}$ (avec h l'épaisseur du gel et a le rayon d'un cylindre). Si le gel était incompressible (coefficient de Poisson de l'ordre de 0.5) on aurait un effet important de confinement quand $\frac{h}{a}$ tend vers 0. Le module d'Young à 50 Pa augmenterait drastiquement avec la diminution de h , et on ne mesurerait plus le module d'Young mais le module d'élasticité isostatique ([Shull et al., 1998]). Ici, pour $\frac{h}{a} \in [0.5; 2]$, on a au contraire une légère augmentation due au fait que le module élastique se renforce avec le nombre d'itérations et que h aussi (cf section 4.6). Ceci valide donc notre mesure.

Sur la figure 4.17 nous avons tracé pour ces mêmes gels l'évolution du module d'Young sous une contrainte de 50 Pa en fonction de l'intensité de fluorescence des gels. On voit que plus le gel est dense, plus son module d'Young à 50 Pa tend à être élevé.

On peut comparer ces résultats à ceux obtenus pour des gels branchés poussant depuis la surface de billes ce qui développe des contraintes internes ([Pujol et al., 2012]). Pour des gels

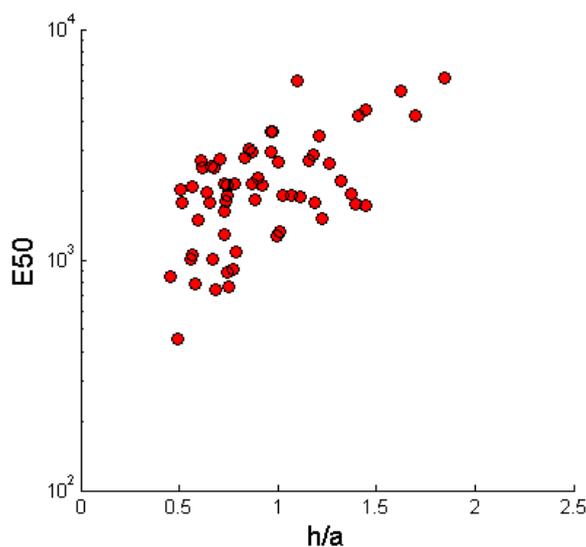


FIGURE 4.16 – Évolution du module élastique à 50 Pa en fonction de l'épaisseur des gels normalisée par le rayon des cylindres pour 24 gels à $[\text{Arp2/3}] = 100 \text{ nM}$.

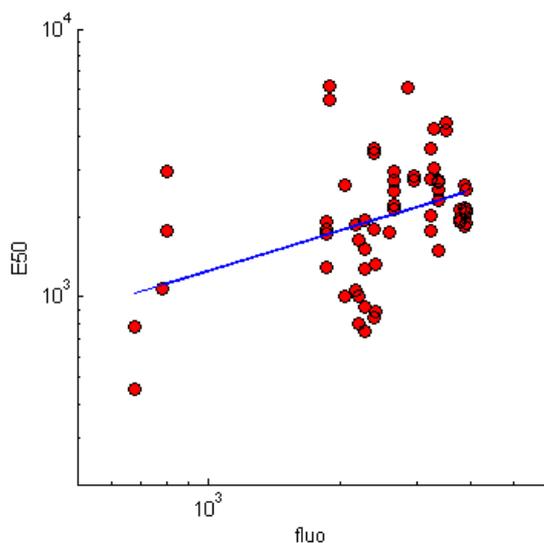


FIGURE 4.17 – Évolution du module élastique à 50 Pa en fonction de l'intensité de fluorescence à $[\text{Arp2/3}] = 100 \text{ nM}$. La droite bleue représente le fit linéaire de $\log(E50)$ en fonction de $\log(\text{fluo})$. La pente est de 0.5, et $R^2 = 0.1656$.

de concentrations à $[\text{Arp2/3}] = 180 \text{ nM}$ et $[\text{Gs}] = 90 \text{ nM}$, [Pujol et al., 2012] rapporte des modules d'Young de l'ordre de 3.4 kPa. En extrapolant nos courbes de module élastique en fonction de la contrainte appliquée pour ces mêmes concentrations, cela correspondrait aux valeurs des modules que nous obtenons à des contraintes internes de l'ordre de 200 Pa. Ce résultat est assez loin des valeurs calculées par des modèles simples ne tenant pas compte de la non-linéarité de l'élasticité ([Noireaux et al., 2000]).

4.4.3 Évolution du module d'Young en fonction de la concentration en Arp2/3

On peut également étudier l'évolution du module d'Young des gels pour une contrainte de 50 Pa en fonction de la concentration en Arp2/3 (figure 4.18).

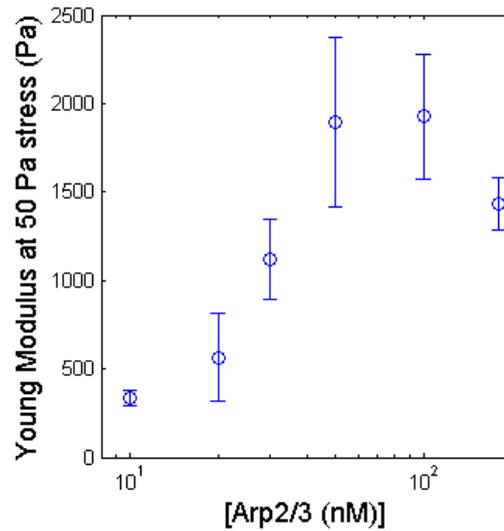


FIGURE 4.18 – Évolution du module élastique à 50 Pa pour différentes concentrations en Arp2/3.

On voit que pour de faibles concentrations en Arp2/3, le module d'Young augmente quand la concentration en Arp2/3 augmente, puis il semble atteindre un plateau aux alentours de 1800 Pa en accord avec les observations de [Pujol et al., 2012] (cf section 2.2.4) .

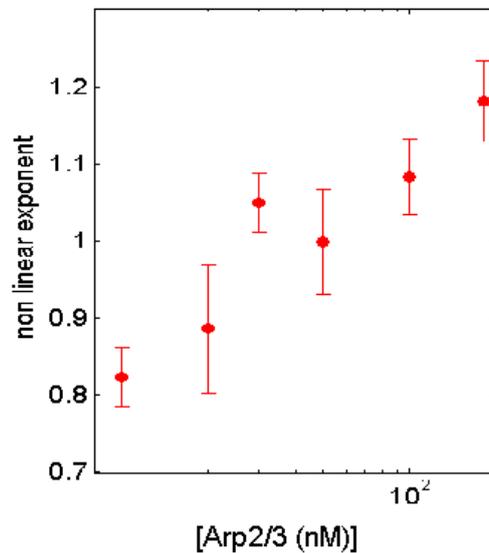


FIGURE 4.19 – Valeur de l'exposant non linéaire des courbes de l'évolution du module d'Young en fonction de la contrainte appliquée.

Nous avons également étudié l'évolution de la non-linéarité des gels en fonction de la concentration en Arp2/3. Nous avons reporté en figure 4.19 la variation de l'exposant non-linéaire (*i.e.* la moyenne des pentes des courbes log-log de E en fonction de la contrainte). Celui-ci augmente

avec la concentration en Arp2/3 mais nous n'avons pas d'explication pour le moment (mais nous travaillons avec Martin Lenz, théoricien au laboratoire LPTMS de l'université Paris Sud, à ce sujet).

4.5 Croissance de gels sous contrainte

Nous nous intéressons ici aux processus de croissance sous contrainte d'un gel d'actine branché contre une paroi.

4.5.1 Extraction des données de vitesse

Les valeurs des vitesses de croissance des gels sont données par les pentes des portions de la courbe de l'épaisseur d'un gel en fonction du temps lorsque le champ appliqué est constant. L'épaisseur des gels ne changeant que très peu sur un palier, on peut considérer que la contrainte est constante durant cette période. Pour obtenir les valeurs de vitesse de croissance des gels, on réalise un fit linéaire sur ces portions de courbes, en démarrant plusieurs points après les rampes de compression et de décompression afin de s'affranchir de tout retard de la déformation liée à la viscosité des gels (voir figure 4.20). Ces résultats sont reportés en figure 4.21.

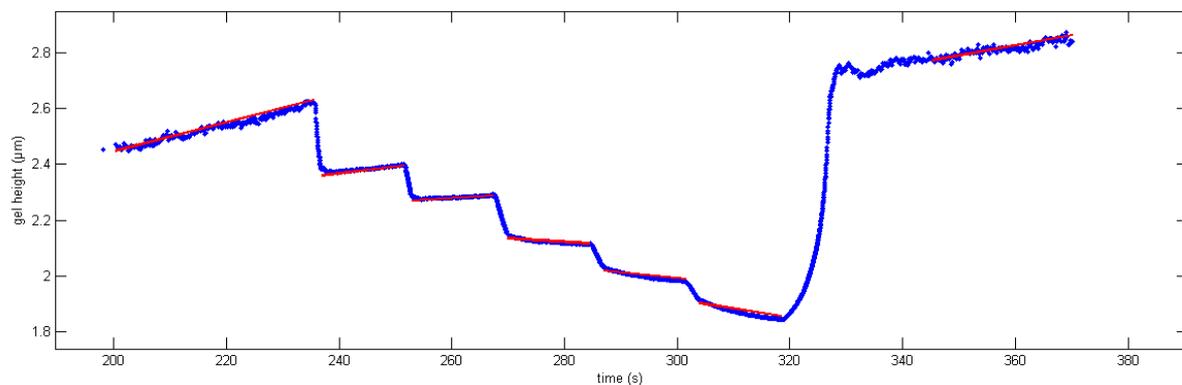


FIGURE 4.20 – Croissance d'un gel d'actine sous force. On peut voir en rouge les fits linéaires des parties à champ constant, et donc à force constante. Les pentes des courbes rouges sont les vitesses de croissance à une force donnée. Les première et dernière portions de la courbe sont plus bruitées car le champ magnétique n'est que de 3 mT, ce qui donne une force de l'ordre de quelques piconewtons, trop faible pour contrer totalement le mouvement des cylindres dû à l'agitation thermique.

On observe que la vitesse diminue quand la contrainte augmente. Lorsque la contrainte est relâchée, la vitesse de polymérisation ré-augmente quasiment au même niveau que lors de la croissance initiale. On observe aussi qu'à forte contrainte axiale on peut avoir des vitesses de croissance négatives, ce qui entraîne une diminution de la taille du gel. Nous proposerons une interprétation quant à ce dernier point en section 4.7.

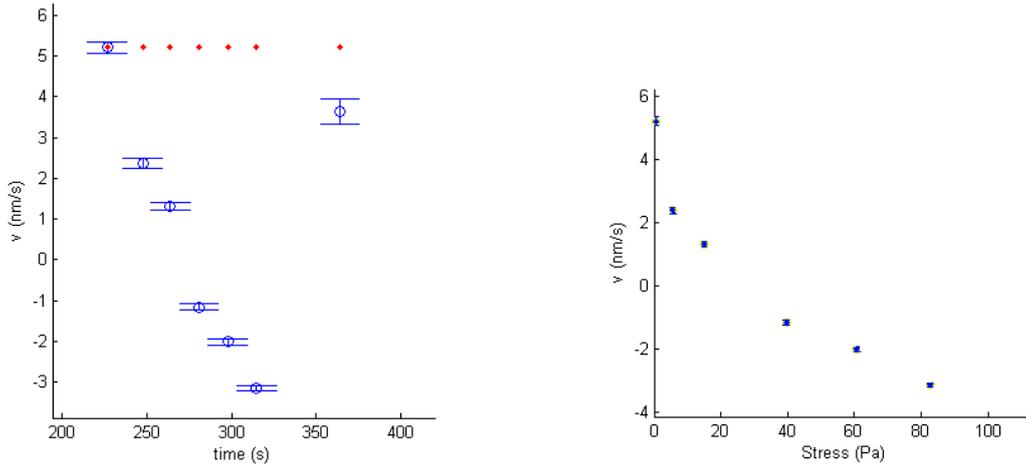


FIGURE 4.21 – Gauche : Évolution de la vitesse en fonction du temps pour la stimulation correspondant à la figure 4.20. Les points rouges correspondent à la vitesse du premier palier à 3 mT afin d’avoir une référence. Droite : Évolution de la vitesse en fonction de la contrainte pour la stimulation correspondant à la figure 4.20.

4.5.2 Caractérisation à $[\text{Arp2/3}] = 100 \text{ nM}$

On peut étudier l’évolution de la vitesse de polymérisation des gels en fonction de la contrainte appliquée avec de grandes statistiques sur une concentration donnée. Ceci est représenté sur la figure 4.22 pour des gels à 100 nM en Arp2/3 et qui ne transitent pas. La vitesse de croissance des gels diminue lorsque la contrainte appliquée augmente, et la contrainte critique σ_c obtenue par le fit par un modèle de Brownian Ratchet ($v = v_{\text{polymerisation}} \times \exp\left(\frac{-\sigma}{\sigma_c}\right) - v_{\text{depolymerisation}}$) est de $155 \text{ Pa} \pm 45 \text{ Pa}$. Au final, cette courbe est assez linéaire, et ne permet pas d’affirmer que la croissance sous contrainte suit un modèle de Brownian Ratchet. C’est un cas intermédiaire entre un profil convexe ([Marcy et al., 2004]) et un profil concave ([Parekh et al., 2005]).

4.5.3 Caractérisation à $[\text{Arp2/3}] < 30 \text{ nM}$

Pour $[\text{Arp2/3}] = 10 \text{ nM}$, et après quelques itérations pour 20 nM et 30 nM, on obtient typiquement une courbe qui atteint des vitesses négatives quand la contrainte augmente (voir figure 4.23). La contrainte critique obtenue par le fit par un modèle de Brownian Ratchet est de $26 \text{ Pa} \pm 14 \text{ Pa}$. La vitesse négative obtenue à forte contrainte est inférieure à la vitesse de dépolymérisation qui est de 2 nm/s . Il semble donc qu’il n’y a pas seulement de la dépolymérisation, mais aussi un comportement que l’on peut interpréter comme du fluage d’un gel "liquide".

Sur la figure 4.24 nous avons tracé l’évolution de la vitesse et de la dérivée de la déformation en fonction de la contrainte appliquée pour un ensemble de gels à $[\text{Arp2/3}] = 30 \text{ nM}$ après transition. Ces données concordent avec un fluage. En effet, pour un matériau viscoélastique que l’on peut modéliser par un amortisseur en série avec un ressort ou un autre élément viscoélastique, un palier de stress soudain entrainera une déformation ϵ augmentant linéairement avec le temps. ϵ étant linéaire avec le stress, $\frac{d\epsilon}{dt}$ doit l’être aussi. C’est ce que l’on observe.

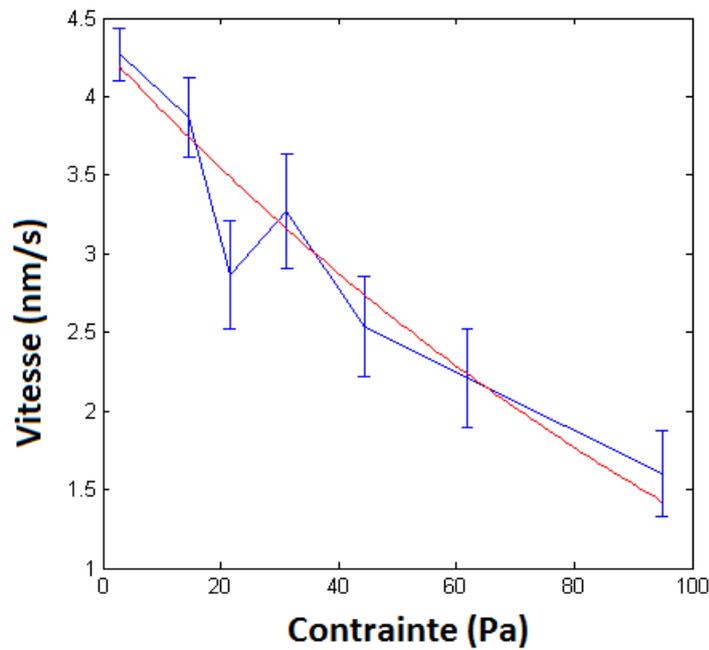


FIGURE 4.22 – Évolution des vitesses de 24 gels en fonction de la contrainte appliquée, avec une concentration de 100 nM en Arp2/3. Bleu : courbe des vitesses. Rouge : fit par un modèle de Brownian Ratchet.

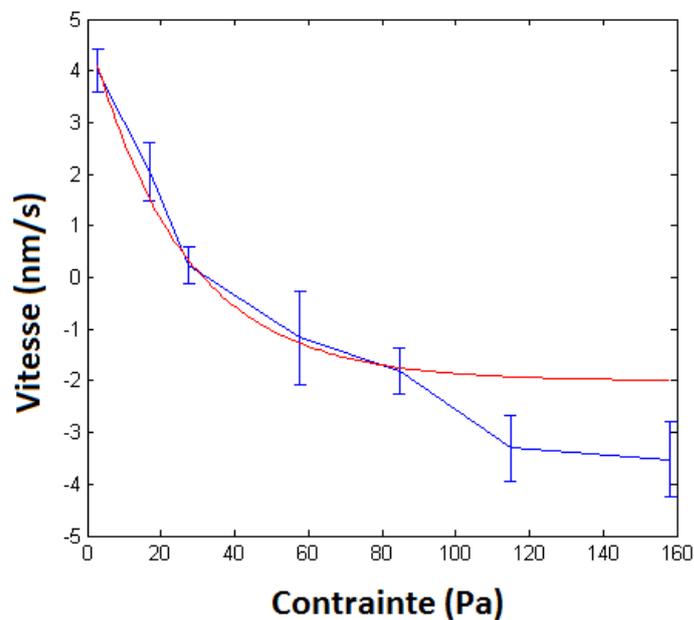


FIGURE 4.23 – Évolution des vitesses de 15 gels en fonction de la contrainte appliquée, avec une concentration de 10 nM en Arp2/3. Bleu : courbe des vitesses. Rouge : fit par un modèle de Brownian Ratchet.

4.6 Effet des itérations sur les propriétés des gels

Dans cette section, nous nous intéressons à l'effet des itérations successives sur la mécanique et sur la croissance sous contrainte des gels.

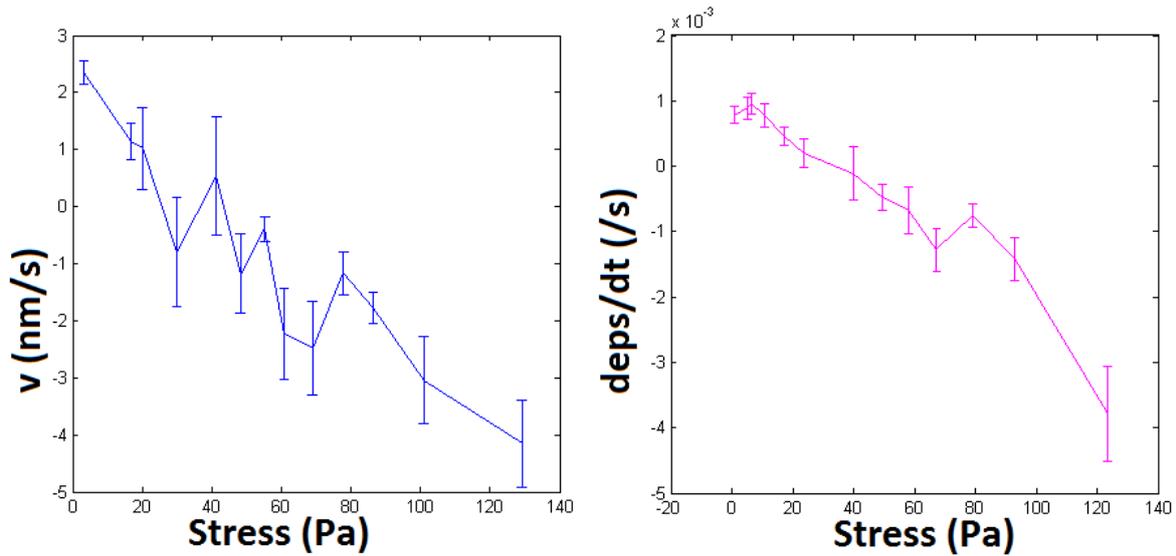


FIGURE 4.24 – Gauche : Évolution des vitesses de 19 gels ayant transité en fonction de la contrainte appliquée, avec une concentration de 30 nM en Arp2/3. Droite : Évolution de la dérivée de la déformation en fonction de la contrainte appliquée pour ces mêmes gels.

4.6.1 Itérations à l'échelle d'un gel

On peut suivre l'évolution du module d'Young d'un gel au cours des sollicitations successives. Par exemple, sur la figure 4.25 on voit la croissance d'un gel et l'évolution de son module d'Young en fonction du temps et en fonction de la contrainte appliquée. Le module ne semble pas affecté par les sollicitations mécaniques dans ce cas là. De même, les vitesses évoluent peu d'une sollicitation à l'autre.

Cependant, les gels que nous sollicitons semblent parfois "transiter" d'un état dur vers un état plus mou. Sur la figure 4.26 on voit la croissance d'un gel et l'évolution de son module d'Young en fonction du temps et en fonction de la contrainte appliquée. L'épaisseur chute brutalement au cours de la deuxième sollicitation. Le module d'Young et les vitesses de croissance chutent drastiquement après la transition.

Effet de la phalloïdine

Une hypothèse pouvant expliquer les transitions pourrait être celle d'un débranchement soudain induit par la mécanique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des mesures sur des gels d'actine ayant polymérisé librement quelques minutes avant que l'on ajoute de la phalloïdine, une drogue qui s'attache aux filaments existants et empêche leur dépolymérisation, rigidifie les filaments, et empêche le débranchement en stabilisant les branches. On place ensuite ce gel sous le champ magnétique et on effectue les sollicitations habituelles. On s'attend ainsi à ce que le gel cesse de croître puisque les filaments d'actine F en solution servant à renouveler constamment le stock d'actine G en solution ne dépolymériseront plus, à ce que le gel d'actine soit plus rigide, et à ce qu'il n'y ait plus de débranchements.

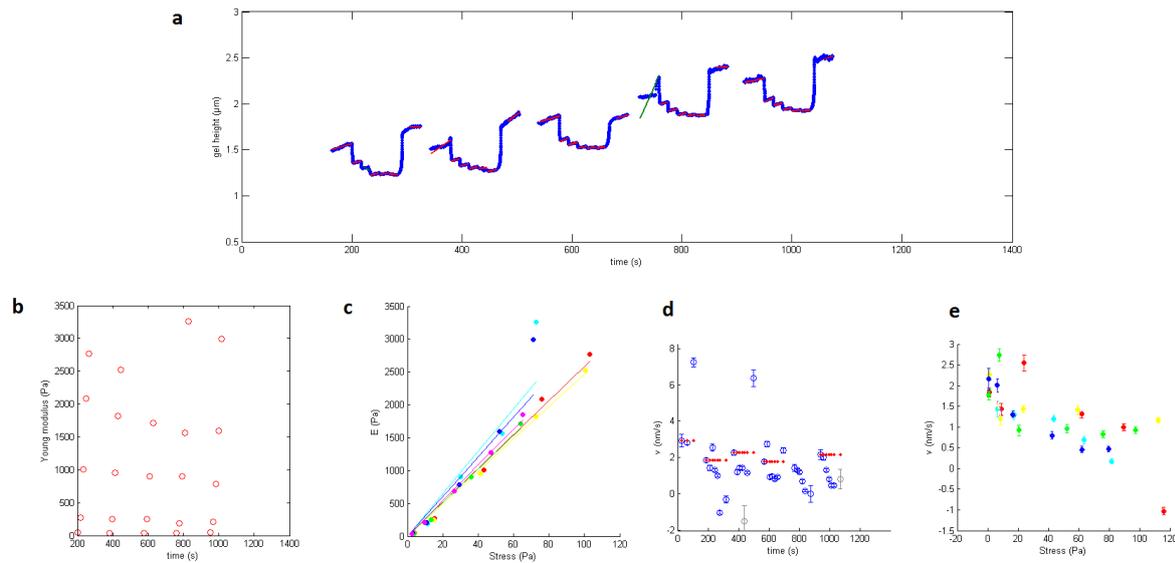


FIGURE 4.25 – a : Évolution d'un gel au cours du temps. b et c : Mécanique du gel. b : évolution du module d'Young du gel au cours du temps. c : Évolution du module d'Young du gel en fonction de la contrainte appliquée. Les couleurs correspondent aux différentes sollicitations en champ magnétique. Le module d'Young ne semble pas évoluer entre les différentes sollicitations. d et e : Évolution des vitesses du gel au cours des différentes sollicitations. Peu de variations sont observées. $[\text{Arp}2/3]=180 \text{ nM}$.

Sur la figure 4.27 nous avons tracé l'évolution d'un gel d'actine à $[\text{Arp}2/3]=20 \text{ nM}$ contenant de la phalloïdine au cours du temps. Il n'y a ici pas de transition du module d'Young alors qu'à cette concentration d'Arp2/3 il y a des transitions lorsqu'il n'y a pas de phalloïdine. Cette expérience tend à valider notre hypothèse que les transitions seraient dues aux débranchements des gels. De plus, on observe des vitesses de croissances négatives à fortes contraintes. Cela renforce notre hypothèse que les vitesses négatives mesurées ne sont pas dues à la dynamique de l'actine mais au fluage.

4.6.2 Évolution des gels en fonction des itérations successives pour différentes concentrations en Arp2/3

On s'intéresse à l'évolution des vitesses de croissance des gels selon la concentration en Arp2/3 au cours des itérations successives de sollicitations ainsi qu'aux modules d'Young (voir figures 4.29 et 4.28). Deux vitesses différentes sont étudiées : la vitesse lorsque le gel n'est pas contraint, et la vitesse lorsque le gel subit une contrainte (donc quand il exerce une force contre une paroi). On considère qu'à faible champ magnétique (3mT) la contrainte exercée par les cylindres sur un gel est négligeable. La vitesse de croissance à une telle valeur de champ est ainsi considérée comme celle d'un gel non contraint. Afin de pouvoir comparer les mesures de vitesses de croissance des gels contraints entre elles, nous décidons de relever pour chaque gel la vitesse de polymérisation contre un cylindre exerçant une contrainte de 50 Pa. Cette dernière vitesse est obtenue en interpo-

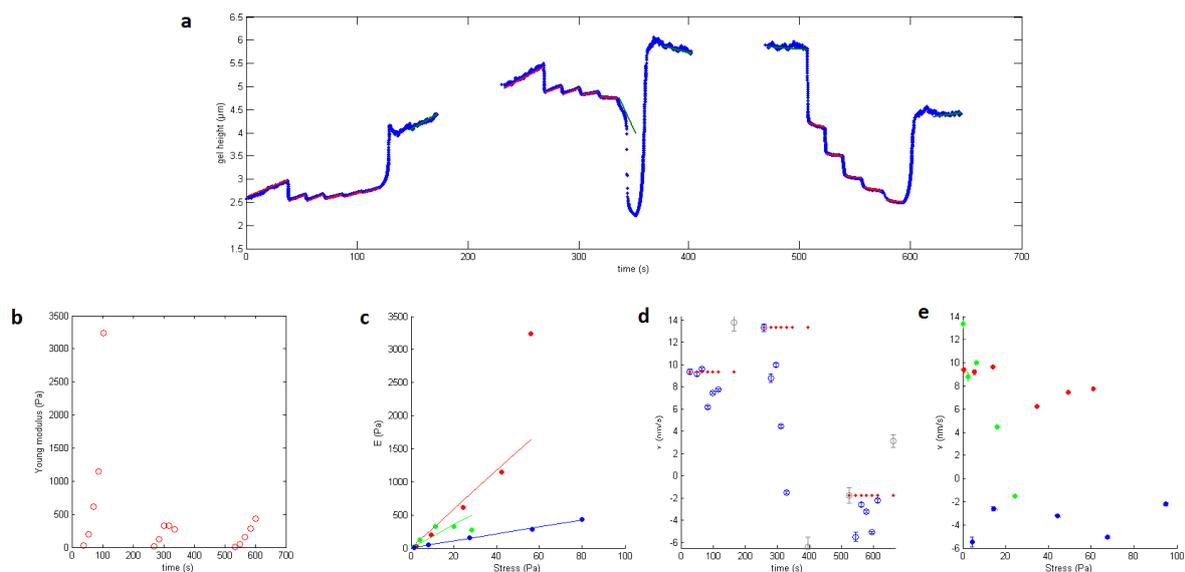


FIGURE 4.26 – a : Transition mécanique d'un gel au cours du temps. b et c : Mécanique du gel. b : Évolution du module d'Young du gel au cours du temps. c : Évolution du module d'Young du gel en fonction de la contrainte appliquée. Rouge : première sollicitation, le gel est "dur". Vert : deuxième sollicitation, le gel transite d'un état "dur" vers un état "mou". Bleu : troisième sollicitation, le gel est "mou". d et e : Transition des vitesses du gel au cours du temps. $[\text{Arp}2/3]=10 \text{ nM}$.

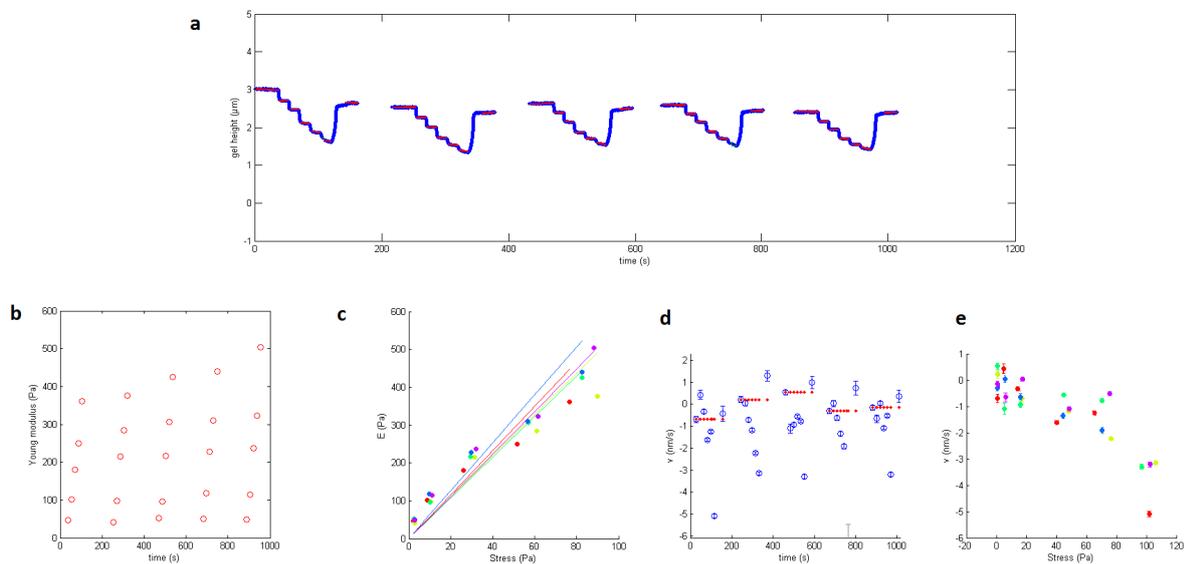


FIGURE 4.27 – a : Évolution d'un gel avec de la phalloïdine au cours du temps. Il n'y a pas de transition, ni pour le module élastique, ni pour la vitesse. $[\text{Arp}2/3]=20 \text{ nM}$.

lant la courbe représentant la vitesse de polymérisation en fonction de la contrainte. Cette valeur de contrainte n'étant pas trop élevée, elle peut être atteinte pour quasiment tous les gels sondés. Pour étudier l'élasticité des gels, on s'intéresse à l'évolution de leur module d'Young à 50 Pa.

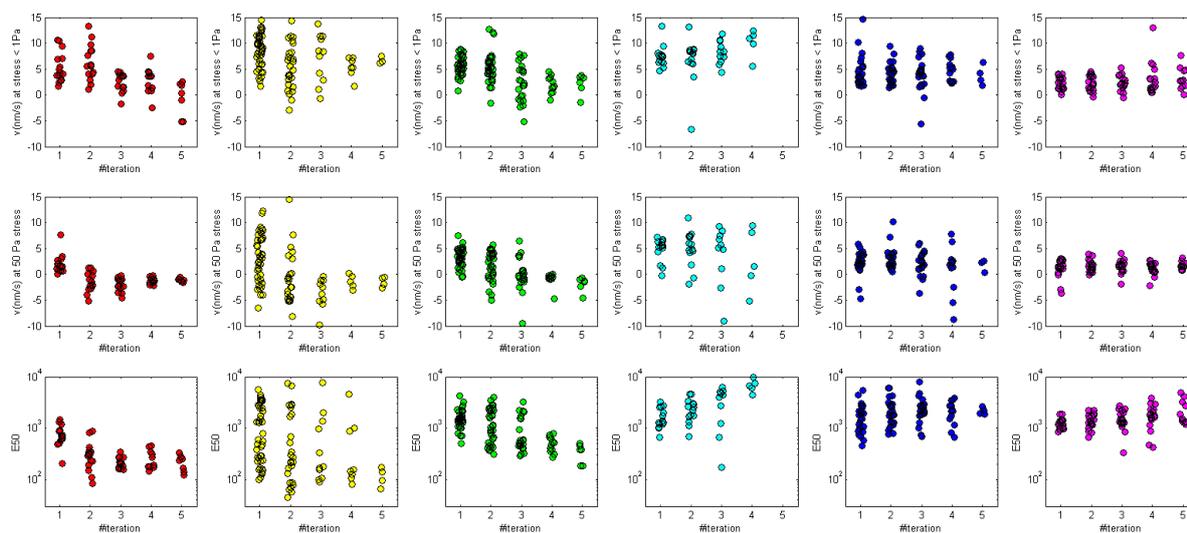


FIGURE 4.28 – En haut : Évolution des vitesses sans contrainte. Au milieu : Évolution des vitesses sous une contrainte de 50 Pa. En bas : Évolution des modules sous une contrainte de 50 Pa. Les différentes couleurs correspondent à des concentrations en Arp2/3 différentes : 10 nM (rouge), 20 nM (jaune), 30 nM (vert), 50 nM (cyan), 100 nM (bleu), 180 nM (violet).

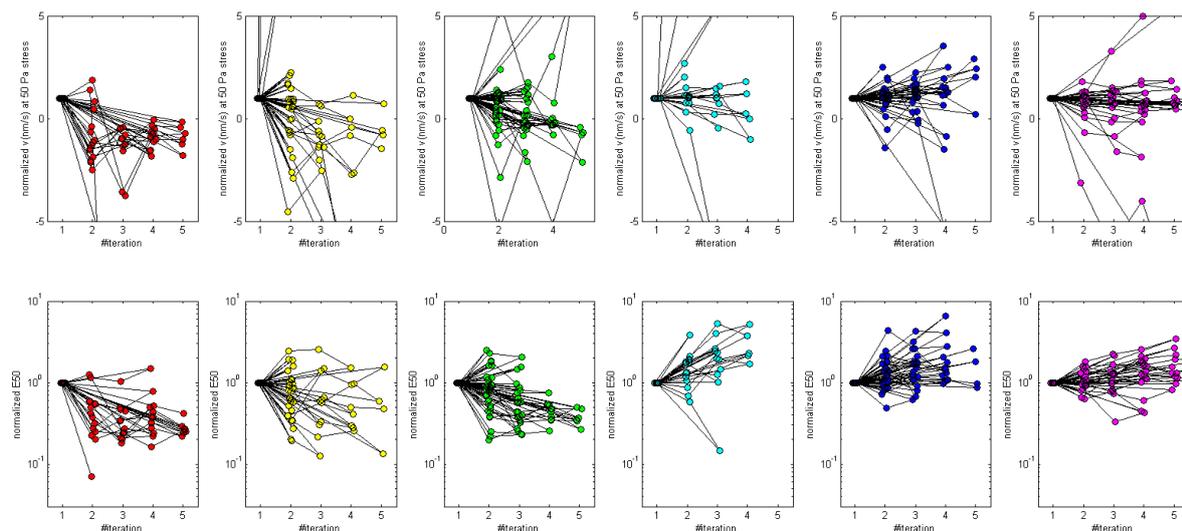


FIGURE 4.29 – En haut : Évolution des vitesses normalisées sous une contrainte de 50 Pa. En bas : Évolution des modules normalisés sous une contrainte de 50 Pa. Les différentes couleurs correspondent à des concentrations en Arp2/3 différentes : 10 nM (rouge), 20 nM (jaune), 30 nM (vert), 50 nM (cyan), 100 nM (bleu), 180 nM (violet).

Sur les graphiques des figures 4.28 et 4.29, on peut voir que pour les différentes concentrations en Arp2/3 testées, certains gels ont été stimulés jusqu'à cinq fois. On observe que pour de faibles concentrations en Arp2/3 (10 nM, 20 nM et 30 nM), les vitesses initiales de même que les vitesses quand un stress de 50 Pa est appliqué diminuent au cours des itérations successives, jusqu'à atteindre des vitesses négatives. Par exemple, pour Arp2/3 = 30 nM, la vitesse initiale passe en moyenne de 5 nm.s⁻¹ à environ 2.5 nm.s⁻¹. Pour cette même concentration, la vitesse sous une contrainte de 50 Pa passe de 3 nm.s⁻¹ à environ -1 nm.s⁻¹. Lorsque la concentration en

Arp2/3 atteint 50 nM et au-delà, les vitesses de polymérisation semblent légèrement augmenter au cours des itérations. On voit également sur ces graphiques que le module élastique à 50 Pa des gels évolue au cours des itérations. Pour de faibles concentrations en Arp2/3 (10 nM, 20 nM et 30 nM) il diminue, ce qui montre que les gels transitent d'un état dur vers un état plus mou. Au contraire, à plus forte concentration en Arp2/3 (> 50 nM) les gels se renforcent aux cours des itérations.

La croissance des gels à forte concentrations en Arp2/3 (50 nM, 100 nM et 180 nM) semble être stimulée par les contraintes axiales successives qu'ils subissent. Ce résultat se rapproche des observations de [Parekh et al., 2005] (voir section 2.3.5) où la vitesse de polymérisation des gels augmente suite à une forte contrainte appliquée. Ceci est aussi en accord avec un modèle de polymérisation auto-catalytique (cf section 2.3). La raison pourrait être que durant la compression, le gel se densifie, et plus de branches sont formées car les filaments sont plus proches de la surface fonctionnalisée avec de la VCA. Il y a alors plus de filaments contre la surface pressante capables de générer des forces lorsque la contrainte est relâchée. Pour de faibles concentrations en Arp2/3 ce phénomène n'est pas observé car il y a une transition mécanique du gel lors des compression, qui est probablement due à du débranchement irréversible. On peut supposer qu'en compressant moins ces derniers on observerait le même phénomène de renforcement des gels.

4.7 Relation entre mécanique et vitesse

Nous cherchons ici à relier les résultats concernant la polymérisation sous contrainte avec la mécanique. Pour cela, nous traçons l'évolution de la vitesse de croissance des gels contre une contrainte axiale à 50 Pa en fonction de leur module élastique à 50 Pa, pour différentes concentrations en Arp2/3. Les résultats sont présentés en figures 4.30 et 4.31. On voit que plus les gels sont durs (ce qui va de pair avec la concentration en [Arp2/3]), plus ils polymérisent rapidement sous contrainte. On voit cette même corrélation pour chaque concentration, même si elle est plus apparente aux concentrations où il y a beaucoup de transitions (figure 4.31). Au contraire, la dépendance du module à 50 Pa à la densité d'actine et la dépendance de la vitesse à 50 Pa à la densité d'actine est beaucoup moins évidente (figure 4.32).

Ce lien entre le module élastique et la vitesse de croissance est étonnant. En effet, le module d'Young des gels caractérise une architecture des gels en volume, tandis que la vitesse de croissance est un phénomène de surface (l'activateur d'Arp2/3 étant sur les cylindres superparamagnétiques).

Les gels subissant des transitions d'un état dur et polymérisant rapidement vers un état plus mou et moins rapide où ils semblent fluer, leur histoire semble affecter leurs propriétés viscoélastiques ainsi que leurs vitesses de croissance. On observe un effet de seuil pour une concentration en Arp2/3 comprise entre 30 nM et 50 nM :

En dessous de cette concentration, l'élasticité initiale est faible et le gel est peu branché. Les itérations successives provoquent des transitions qui pourraient provenir d'un vieillissement des

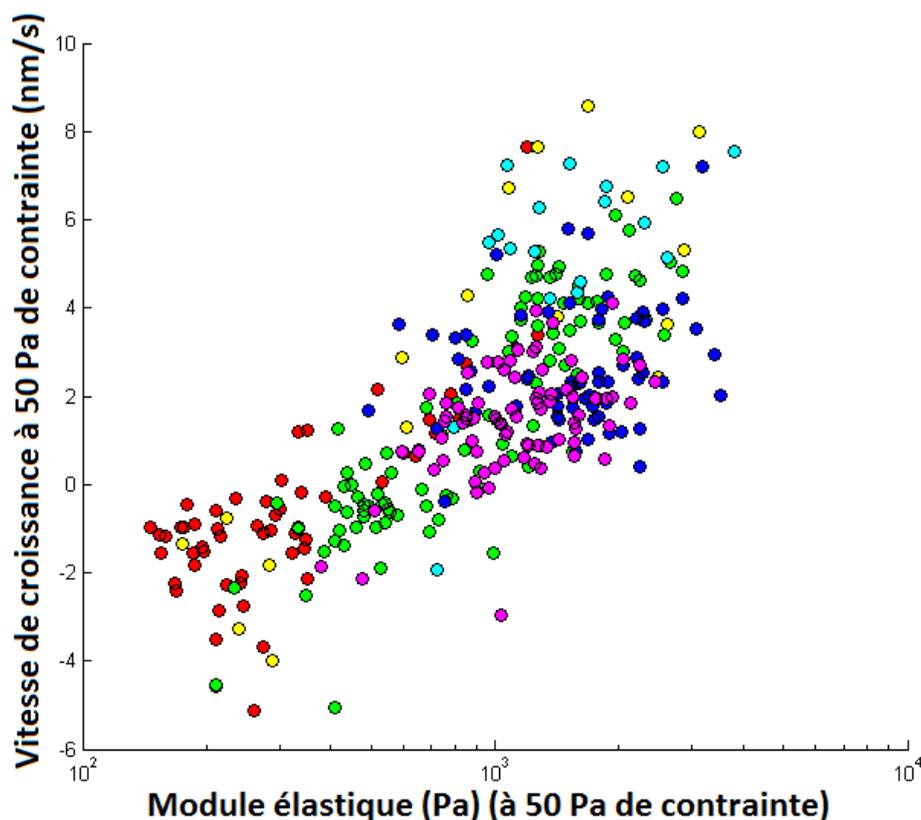


FIGURE 4.30 – Évolution de la vitesse en fonction du module pour une contrainte à 50 Pa pour différentes architectures. Les différentes couleurs correspondent à des concentrations en Arp2/3 différentes : 10 nM (rouge), 20 nM (jaune), 30 nM (vert), 50 nM (cyan), 100 nM (bleu), 180 nM (violet).

gels au cours des différentes sollicitations, où le réseau branché subit des réorganisations internes, à la fois spontanées et sous contrainte. Il peut par exemple y avoir du débranchement au sein du réseau, ne laissant ainsi plus que des enchevêtrements. Les résultats obtenus dans les expériences en présence de phalloïdine renforcent cette idée. Ce débranchement sous contrainte peut avoir des effets importants sur l'élasticité du réseau, comme suggéré par un résultat théorique récent sur des réseaux de ressorts désordonnés (cf [Goodrich et al., 2015]), où un élagage sélectif de quelques liens très contraints change le module élastique du réseau de plusieurs ordres de grandeur. Le nouveau gel crée flue alors à l'intérieur de l'ancien gel.

Au-delà de cette concentration critique, les gels sont plus durs, et les sollicitations que nous avons appliquées ne suffisent pas à provoquer suffisamment de débranchements pour qu'il n'y ait plus de connectivité au sein du réseau. Celui-ci se maintient, et le nouveau gel poussant sous contrainte étant plus dur, la vitesse de polymérisation est renforcée. On ne sait cependant pas si sa diminution de vitesse en fonction de la contrainte est due à un processus de Brownian Ratchett ou à un fluage.

Ainsi, la croissance des réseaux d'actine sous contrainte paraît dépendre principalement de l'état visco-élastique du réseau. Le moteur de la polymérisation marche en permanence, mais

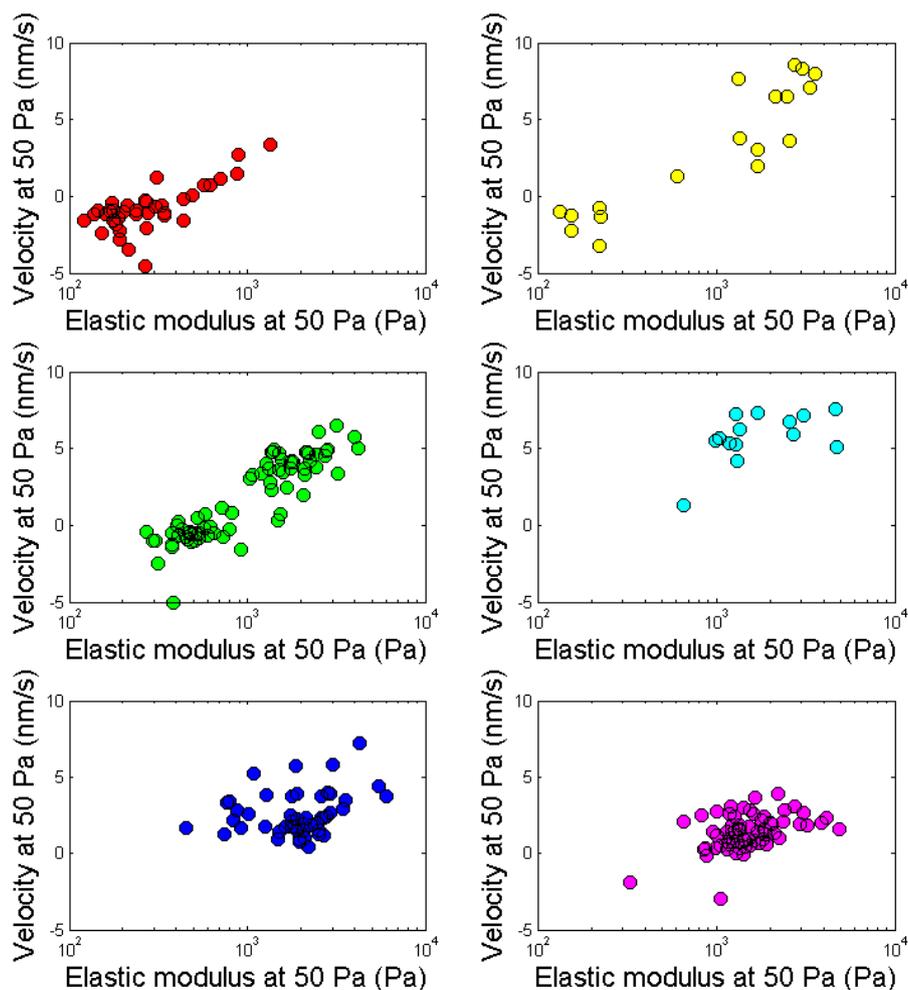


FIGURE 4.31 – Évolution de la vitesse en fonction du module pour une contrainte à 50 Pa pour différentes architectures. Les différentes couleurs correspondent à des concentrations en Arp2/3 différentes : 10 nM (rouge), 20 nM (jaune), 30 nM (vert), 50 nM (cyan), 100 nM (bleu), 180 nM (violet).

le "nouveau gel" semble pénétrer au sein de l'"ancien gel". Les phénomènes de fluage et de polymérisation étant couplés, il n'est pas possible de les mesurer séparément. Ce couplage peut être modélisé par le schéma équivalent 4.33, qui est l'assemblage d'un solide viscoélastique non-linéaire avec un liquide visqueux, associés à un moteur de la polymérisation.

Dans la cellule, le réseau d'actine au sein du lamellipode peut également fluer. Ainsi, pour tenir compte de la manière dont la cellule génère des forces, il faut aussi considérer que les filaments d'actine nouvellement créés s'appuient eux-mêmes sur un réseau pouvant fluer.

4.8 Ce qu'il reste à faire

Afin de compléter les résultats obtenus au cours de cette thèse, plusieurs expériences permettraient d'avancer dans la compréhension des phénomènes observés.

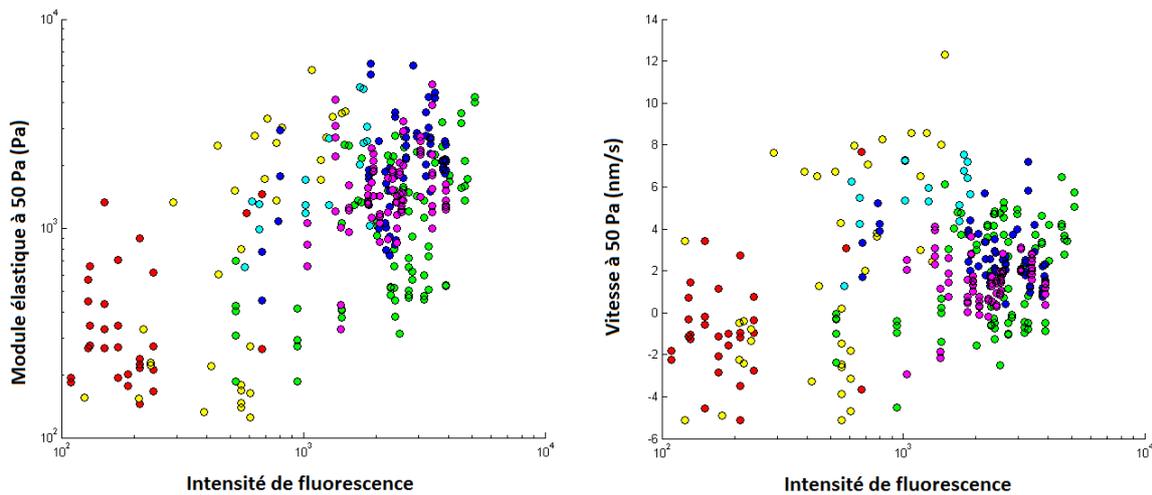


FIGURE 4.32 – Gauche : Évolution du module élastique à 50 Pa des gels en fonction de la fluorescence. Droite : évolution de la vitesse de croissance des gels à 50 Pa en fonction de la fluorescence.

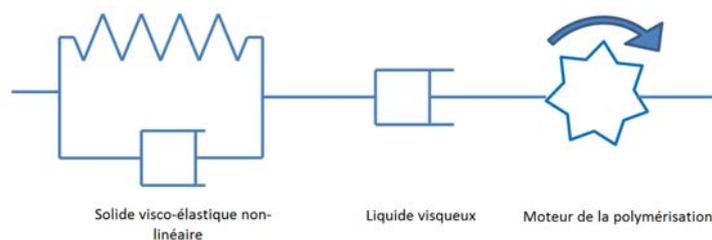


FIGURE 4.33 – Schéma équivalent modélisant les propriétés visco-élastiques des gels d'actine. Il y a un couplage entre le fluage et la polymérisation.

Tout d'abord, il serait intéressant de faire pousser les gels en continu sous une contrainte forte afin de voir si la mécanique des gels et la densité en sont affectées. Ceci n'est pour l'instant pas réalisable avec notre système expérimental à cause de l'échauffement des bobines sur le long terme à champ fort qui fait monter la température de l'échantillon.

Il serait également intéressant de faire des expériences en laissant tout d'abord les gels polymériser à très faible champ magnétique (3 mT) pendant plusieurs minutes, puis de faire des itérations successives. Le but d'une telle expérience est de voir si on a effectivement une transition mécanique due aux sollicitations ou si c'est un vieillissement du gel que l'on observe.

Également, la cofiline peut jouer un rôle sur les transitions, puisqu'en s'attachant aux filaments d'actine, elle change leur longueur de persistance et les casse. En l'enlevant du système biochimique, on pourrait voir son effet sur les transitions. Pour cela, il faut passer à un autre système biochimique avec de l'actine G et des fragments plus grands de WASP.

Au cours des travaux effectués durant cette thèse, nous avons principalement étudié l'effet des variations de concentration en Arp2/3 sur la non-linéarité des gels. Tout comme dans les travaux de [Pujol et al., 2012], il serait également intéressant de changer la concentration en

gelsoline pour voir son effet sur la non linéarité.

Afin de préciser l'effet du confinement, il faut également faire des expériences avec des cylindres de tailles plus grandes, ce qui permettra de diminuer le rapport $\frac{h}{a} < 1$ (avec h l'épaisseur du gel et a le rayon d'un cylindre).

Bibliographie

- [Achard et al., 2010] Achard, V., Martiel, J. L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A. C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A "Primer"-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility. *Current Biology*, 20(5) :423–428.
- [Allison, 1999] Allison, S. a. (1999). Low Reynolds number transport properties of axisymmetric particles employing stick and slip boundary conditions. *Macromolecules*, 32(16) :5304–5312.
- [Auernhammer et al., 2008] Auernhammer, G., Butt, H.-J., and Vollmer, D. (2008). *Surface and Interfacial Forces - From Fundamentals to Applications*.
- [Bathe et al., 2008] Bathe, M., Heussinger, C., Claessens, M. M. a. E., Bausch, A. R., and Frey, E. (2008). Cytoskeletal bundle mechanics. *Biophysical journal*, 94(8) :2955–2964.
- [Bausch and Kroy, 2006] Bausch, a. R. and Kroy, K. (2006). A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics*, 2(4) :231–238.
- [Bergert et al., 2015] Bergert, M., Erzberger, A., Desai, R. a., Aspalter, I. M., Oates, A. C., Charras, G., Salbreux, G., and Paluch, E. K. (2015). Force transmission during adhesion-independent migration. *Nature Cell Biology*, 17(4).
- [Berre et al., 2015] Berre, L., Liu, Y.-j., and Piel, M. (2015). Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells Graphical Abstract Article Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells. pages 659–672.
- [Bing et al., 2006] Bing, P., Hui-min, X., Bo-qin, X., and Fu-long, D. (2006). Performance of sub-pixel registration algorithms in digital image correlation. *Measurement Science and Technology*, 17(6) :1615–1621.
- [Binnig et al., 1986] Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9) :930–933.
- [Blanchoin et al., 2014] Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, 94(1) :235–63.
- [Borisov and Svitkina, 2000] Borisov, G. G. and Svitkina, T. M. (2000). Actin machinery : Pushing the envelope. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(1) :104–112.
- [Brangbour et al., 2011] Brangbour, C., du Roure, O., Helfer, E., Démoulin, D., Mazurier, A., Fermigier, M., Carrier, M.-F., Bibette, J., and Baudry, J. (2011). Force-velocity measurements of a few growing actin filaments. *PLoS biology*, 9(4) :e1000613.

- [Bray and White, 1988] Bray, D. and White, J. G. (1988). Cortical flow in animal cells. *Science*, 239(4842) :883–888.
- [Broedersz, 2011] Broedersz, C. P. (2011). Mechanics and Dynamics of Biopolymer Networks. *Thesis*, page 210.
- [Brohawn et al., 2014] Brohawn, S. G., Su, Z., and MacKinnon, R. (2014). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9) :3614–3619.
- [Byun et al., 2013] Byun, S., Son, S., Amodei, D., Cermak, N., Shaw, J., Kang, J. H., Hecht, V. C., Winslow, M. M., Jacks, T., Mallick, P., and Manalis, S. R. (2013). Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19) :7580–5.
- [Caille et al., 2002] Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y., and Meister, J.-J. (2002). Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 35(2) :177–187.
- [Cameron et al., 1999] Cameron, L. a., Footer, M. J., van Oudenaarden, a., and Theriot, J. a. (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9) :4908–4913.
- [Campellone and Welch, 2010] Campellone, K. G. and Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race : cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4) :237–251.
- [Carlier et al., 2003] Carlier, M. F., Le Clainche, C., Wiesner, S., and Pantaloni, D. (2003). Actin-based motility : From molecules to movement. *BioEssays*, 25(4) :336–345.
- [Carlsson, 2003] Carlsson, a. E. (2003). Growth velocities of branched actin networks. *Biophysical journal*, 84(5) :2907–2918.
- [Carlsson and Carlsson, 2001] Carlsson, A. E. and Carlsson, A. E. (2001). Growth of Branched Actin Networks against Obstacles. *Biophysical Journal*, 81(October) :1907–1923.
- [Charras and Paluch, 2008] Charras, G. and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way : how to migrate without lamellipodia. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(9) :730–736.
- [Chaudhuri et al., 2007] Chaudhuri, O., Parekh, S. H., and Fletcher, D. a. (2007). Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445(7125) :295–8.
- [Cho, 2010] Cho, D. (2010). *Méthode des éléments-finis par l'exemple*.
- [Choquet et al., 1997] Choquet, D., Felsenfeld, D. P., and Sheetz, M. P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1) :39–48.
- [Chowdhury et al., 2010] Chowdhury, F., Na, S., Li, D., Poh, Y.-C., Tanaka, T. S., Wang, F., and Wang, N. (2010). Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nature materials*, 9(1) :82–88.
- [Claessens et al., 2006] Claessens, M. M. a. E., Bathe, M., Frey, E., and Bausch, A. R. (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. *Nature materials*, 5(9) :748–753.

- [Coirault et al., 2003] Coirault, C., Pourny, J.-C., Lambert, F., and Lecarpentier, Y. (2003). Les pinces optiques en biologie et en médecine. *Médecine/Sciences*, 19(3) :364–367.
- [Cross et al., 2008] Cross, S. E., Jin, Y.-S., Tondre, J., Wong, R., Rao, J., and Gimzewski, J. K. (2008). AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology*, 19(38) :384003.
- [Dabiri et al., 1990] Dabiri, G. a., Sanger, J. M., Portnoy, D. a., and Southwick, F. S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16) :6068–6072.
- [Davenport et al., 1993] Davenport, R. W., Dou, P., Rehder, V., and Kater, S. B. (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature*, 361(6414) :721–724.
- [Davies, 2009] Davies, P. F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6(1) :16–26.
- [De Gennes, 1974] De Gennes, P. G. (1974). Coil-stretch transition of dilute flexible polymers under ultrahigh velocity gradients. *The Journal of Chemical Physics*, 60(12) :5030–5042.
- [Démoulin, 2012] Démoulin, D. (2012). *Les billes magnétiques comme capteurs de force : application à la pression de croissance de filaments d'actine*.
- [Dendukuri et al., 2007] Dendukuri, D., Gu, S. S., Pregibon, D. C., Hatton, T. A., and Doyle, P. S. (2007). Stop-flow lithography in a microfluidic device. *Lab on a chip*, 7(7) :818–828.
- [du Roure et al., 2005] du Roure, O., Saez, A., Buguin, A., Austin, R. H., Chavrier, P., Silberzan, P., and Ladoux, B. (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7) :2390–2395.
- [Dumas-Bouchiat et al., 2010] Dumas-Bouchiat, F., Zanini, L. F., Kustov, M., Dempsey, N. M., Grechishkin, R., Hasselbach, K., Orlianges, J. C., Champeaux, C., Catherinot, a., and Givord, D. (2010). Thermomagnetically patterned micromagnets. *Applied Physics Letters*, 96(10) :1–4.
- [Ehrlicher et al., 2011] Ehrlicher, a. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. a., and Stossel, T. P. (2011). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*, 478(7368) :260–263.
- [Engler et al., 2006] Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4) :677–689.
- [Fabry et al., 2001] Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D., and Fredberg, J. J. (2001). Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, 87(14) :1–4.
- [Fackler and Grosse, 2008] Fackler, O. T. and Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *The Journal of Cell Biology*, 181(6) :879–884.
- [Fletcher and Mullins, 2010] Fletcher, D. a. and Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280) :485–492.
- [Footer et al., 2007] Footer, M. J., Kerssemakers, J. W. J., Theriot, J. a., and Dogterom, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an

- optical trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7) :2181–2186.
- [Friedl and Bro, 2000] Friedl, P. and Bro, E. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *57* :41–64.
- [Friedl and Wolf, 2003] Friedl, P. and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5) :362–374.
- [Gardel et al., 2006] Gardel, M. L., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Crocker, J. C., Stossel, T. P., and Weitz, D. a. (2006). Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6) :1762–1767.
- [Gardel et al., 2004] Gardel, M. L., Shin, J. H., MacKintosh, F. C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., and Weitz, D. a. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675) :1301–1305.
- [Gardel et al., 2003] Gardel, M. L., Valentine, M. T., Crocker, J. C., Bausch, a. R., and Weitz, D. a. (2003). Microrheology of entangled F-actin solutions. *Physical review letters*, 91(15) :158302.
- [Goley and Welch, 2006] Goley, E. D. and Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex : an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(10) :713–726.
- [Goodrich et al., 2015] Goodrich, C. P., Liu, A. J., and Nagel, S. R. (2015). The Principle of Independent Bond-Level Response : Tuning by Pruning to Exploit Disorder for Global Behavior. *Physical Review Letters*, 114(22) :225501.
- [Gressin et al., 2015] Gressin, L., Guillotin, A., Guérin, C., Blanchoin, L., and Michelot, A. (2015). Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly. *Current Biology*, 25(11) :1437–1447.
- [Guck et al., 2001] Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T. J., Cunningham, C. C., and Käs, J. (2001). The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical journal*, 81(2) :767–784.
- [Guck et al., 2005] Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H. M., Ananthakrishnan, R., Mitchell, D., Käs, J., Ulvick, S., and Bilby, C. (2005). Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence. *Biophysical Journal*, 88(5) :3689–3698.
- [Hamill and Martinac, 2001] Hamill, O. P. and Martinac, B. (2001). Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells. *81(2)* :685–740.
- [Head et al., 2003] Head, D., Levine, A., and MacKintosh, F. (2003). Deformation of Cross-Linked Semiflexible Polymer Networks. *Physical Review Letters*, 91(10) :2–5.
- [Heidemann et al., 1999] Heidemann, S. R., Kaech, S., Buxbaum, R. E., and Matus, A. (1999). Living Fibroblasts. *Cell*, 145(1) :109–122.
- [Heng and Koh, 2010] Heng, Y.-W. and Koh, C.-G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(10) :1622–1633.

- [Heussinger and Frey, 2007] Heussinger, C. and Frey, E. (2007). Role of architecture in the elastic response of semiflexible polymer and fiber networks. *Physical Review E*, 75(1) :11917.
- [Isambert et al., 1995] Isambert, Venier, and Maggs (1995). Flexibility of Actin Filaments Derived from Thermal FLuctuations. *The journal of biological chemistry*, 270(19) :11437–11444.
- [Jiang and McFarland, 2004] Jiang, P. and McFarland, M. J. (2004). Large-scale fabrication of wafer-size colloidal crystals, macroporous polymers and nanocomposites by spin-coating. *Journal of the American Chemical Society*, 126(42) :13778–13786.
- [Johnson et al., 2008] Johnson, A. K., Zawadzka, A. M., Deobald, L. a., Crawford, R. L., and Paszczyński, A. J. (2008). Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(6) :1009–1025.
- [Joly-Duhamel et al., 2002] Joly-Duhamel, C., Hellio, D., Ajdari, A., and Djabourov, M. (2002). All Gelatin Networks :2. The Master Curve for Elasticity. *Langmuir*, 18(19) :7158–7166.
- [Kabsch et al., 1990] Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin :DNase I complex.
- [Karcher et al., 2003] Karcher, H., Lammerding, J., Huang, H., Lee, R. T., Kamm, R. D., and Kaazempur-Mofrad, M. R. (2003). A three-dimensional viscoelastic model for cell deformation with experimental verification. *Biophysical journal*, 85(5) :3336–3349.
- [Kauffmann et al., 2011] Kauffmann, P., Ith, A., O'Brien, D., Gaude, V., Boué, F., Combe, S., Bruckert, F., Schaack, B., Dempsey, N. M., Haguet, V., and Reyne, G. (2011). Diamagnetically trapped arrays of living cells above micromagnets. *Lab on a chip*, 11(18) :3153–3161.
- [Kilinc and Lee, 2014] Kilinc, D. and Lee, G. U. (2014). Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 6(1) :27–34.
- [Koestler et al., 2009] Koestler, S. a., Rottner, K., Lai, F., Block, J., Vinzenz, M., and Small, J. V. (2009). F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *PLoS ONE*, 4(3) :3–7.
- [Kovar and Pollard, 2004] Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41) :14725–14730.
- [Kunda et al., 2008] Kunda, P., Pelling, A. E., Liu, T., and Baum, B. (2008). Moesin Controls Cortical Rigidity, Cell Rounding, and Spindle Morphogenesis during Mitosis. *Current Biology*, 18(2) :91–101.
- [Lansbergen et al., 2006] Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., Ohtsuka, T., Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A. B., Grosveld, F., and Akhmanova, A. (2006). CLASPs Attach Microtubule Plus Ends to the Cell Cortex through a Complex with LL5 β . *Developmental Cell*, 11(1) :21–32.
- [Le Clainche and Carlier, 2008] Le Clainche, C. and Carlier, M.-F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews*, 88(2) :489–513.

- [Letourneau and Shattuck, 1989] Letourneau, P. C. and Shattuck, T. a. (1989). Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. *Development (Cambridge, England)*, 105(3) :505–519.
- [Lewis, 2000] Lewis, J. A. (2000). Colloidal processing of ceramics and composites. *Journal of the American Ceramic Society*, 83(10) :2341–2359.
- [Lieleg et al., 2007] Lieleg, O., Claessens, M. M. a. E., Heussinger, C., Frey, E., and Bausch, a. R. (2007). Mechanics of bundled semiflexible polymer networks. *Physical Review Letters*, 99(8) :3–6.
- [Loisel et al., 1999] Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, 401(6753) :613–616.
- [Luo et al., 2013] Luo, T., Mohan, K., Iglesias, P. a., and Robinson, D. N. (2013). Molecular mechanisms of cellular mechanosensing. *Nature materials*, 12(October) :1064–71.
- [Mackintosh, Käs, Janmey, 1995] Mackintosh, Käs, Janmey (1995). Elasticity of Semiflexible Biopolymer Network. 75(24) :4425–4429.
- [Maiuri et al., 2015] Maiuri, P., Rupprecht, J.-F., Wieser, S., Ruprecht, V., Bénichou, O., Carpi, N., Coppey, M., de Beco, S., Gov, N., Heisenberg, C.-P., Lage Crespo, C., Lautenschlaeger, F., Le Berre, M., Lennon-Dumenil, Ana-Maria Raab, M., Thiam, H.-R., Piel, M., Sixt, M., and Voituriez, R. (2015). Actin Flows Mediate a Universal Coupling between Theory Actin Flows Mediate a Universal Coupling between Cell Speed and Cell Persistence. *Cell*, pages 1–13.
- [Manosas et al., 2012] Manosas, M., Perumal, S. K., Croquette, V., and Benkovic, S. J. (2012). Direct observation of stalled fork restart via fork regression in the T4 replication system. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6111) :1217–20.
- [Marcy et al., 2004] Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.-F., and Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16) :5992–5997.
- [Mattila and Lappalainen, 2008a] Mattila, P. K. and Lappalainen, P. (2008a). Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(6) :446–454.
- [Mattila and Lappalainen, 2008b] Mattila, P. K. and Lappalainen, P. (2008b). Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(6) :446–454.
- [McCullough et al., 2008] McCullough, B. R., Blanchoin, L., Martiel, J. L., and De La Cruz, E. M. (2008). Cofilin Increases the Bending Flexibility of Actin Filaments : Implications for Severing and Cell Mechanics. *Journal of Molecular Biology*, 381(3) :550–558.
- [McGrath et al., 2003] McGrath, J. L., Eungdamrong, N. J., Fisher, C. I., Peng, F., Mahadevan, L., Mitchison, T. J., and Kuo, S. C. (2003). The force-velocity relationship for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Current Biology*, 13(4) :329–332.
- [Min et al., 2013] Min, D., Kim, K., Hyeon, C., Cho, Y. H., Shin, Y.-K., and Yoon, T.-Y. (2013). Mechanical unzipping and re-zipping of a single SNARE complex reveals hysteresis as a force-generating mechanism. *Nature communications*, 4 :1705.

- [Mitchison and Cramer, 1996] Mitchison, T. J. and Cramer, L. P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84(3) :371–379.
- [Mofrad, 2009] Mofrad, M. R. (2009). Rheology of the Cytoskeleton. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 41(1) :433–453.
- [Mogilner and Oster, 1996] Mogilner, a. and Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophysical journal*, 71(6) :3030–3045.
- [Noireaux et al., 2000] Noireaux, V., Golsteyn, R. M., Friederich, E., Prost, J., Antony, C., Louvard, D., and Sykes, C. (2000). Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophysical Journal*, 78(3) :1643–1654.
- [Nunes et al., 2010] Nunes, J., Herlihy, K. P., Mair, L., Superfine, R., and Desimone, J. M. (2010). Multifunctional shape and size specific magneto-polymer composite particles. *Nano Letters*, 10(4) :1113–1119.
- [O’Connell et al., 2001] O’Connell, C. B., Warner, A. K., and Wang, Y.-l. (2001). Distinct roles of the equatorial and polar cortices in the cleavage of adherent cells. *Current Biology*, 11(9) :702–707.
- [Ommering, 2006] Ommering, K. V. (2006). Magnetic properties of sub-micrometer superparamagnetic beads used for biosensors. *Philips Research Europe*.
- [Osman et al., 2012] Osman, O., Zanini, L. F., Frénéa-Robin, M., Dumas-Bouchiat, F., Dempsey, N. M., Reyne, G., Buret, F., and Haddour, N. (2012). Monitoring the endocytosis of magnetic nanoparticles by cells using permanent micro-flux sources. *Biomedical Microdevices*, 14(5) :947–954.
- [Otomo et al., 2005] Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M., and Rosen, M. K. (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, 433(7025) :488–494.
- [Parekh et al., 2005] Parekh, S. H., Chaudhuri, O., Theriot, J. a., and Fletcher, D. a. (2005). Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nature cell biology*, 7(12) :1219–1223.
- [Paul and Pollard, 2009] Paul, A. S. and Pollard, T. D. (2009). Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(8) :606–617.
- [Peskin et al., 1993] Peskin, C. S., Odell, G. M., and Oster, G. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations : the brownian ratchet. *Biophysical Journal*, 65(July) :316–324.
- [Pinner and Sahai, 2008] Pinner, S. and Sahai, E. (2008). PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol*, 10(2) :127–137.
- [Pollard and Borisy, 2003] Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4) :453–65.
- [Pomorski et al., 2007] Pomorski, P., Krzemiński, P., Wasik, A., Wierzbicka, K., Barańska, J., and Kłopočka, W. (2007). Actin dynamics in Amoeba proteus motility. *Protoplasma*, 231(1-2) :31–41.

- [Prass et al., 2006] Prass, M., Jacobson, K., Mogilner, A., and Radmacher, M. (2006). Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *Journal of Cell Biology*, 174(6) :767–772.
- [Prochniewicz et al., 2005] Prochniewicz, E., Janson, N., Thomas, D. D., and De La Cruz, E. M. (2005). Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *Journal of Molecular Biology*, 353(5) :990–1000.
- [Pujol et al., 2012] Pujol, T., du Roure, O., Fermigier, M., and Heuvingh, J. (2012). Impact of branching on the elasticity of actin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26) :10364–10369.
- [Rolland et al., 2005] Rolland, J. P., Maynor, B. W., Euliss, L. E., Exner, A. E., Denison, G. M., and DeSimone, J. M. (2005). Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials. *Journal of the American Chemical Society*, 127(28) :10096–10100.
- [Sahai et al., 2007] Sahai, E., Garcia-Medina, R., Pouysségur, J., and Vial, E. (2007). Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *The Journal of Cell Biology*, 176(1) :35–42.
- [Sahai and Marshall, 2003] Sahai, E. and Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, 5(8) :711–719.
- [Saphirstein et al., 2013] Saphirstein, R. J., Gao, Y. Z., Jensen, M. H., Gallant, C. M., Vetterkind, S., Moore, J. R., and Morgan, K. G. (2013). The Focal Adhesion : A Regulated Component of Aortic Stiffness. *PLoS ONE*, 8(4).
- [Schaus and Borisy, 2008] Schaus, T. E. and Borisy, G. G. (2008). Performance of a population of independent filaments in lamellipodial protrusion. *Biophysical journal*, 95(3) :1393–1411.
- [Sedzinski et al., 2011] Sedzinski, J., Biro, M., Oswald, A., Tinevez, J.-Y., Salbreux, G., and Paluch, E. (2011). Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature*, 476(7361) :462–466.
- [Seltmann et al., 2013] Seltmann, K., Fritsch, A. W., Käs, J. a., and Magin, T. M. (2013). Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46) :18507–12.
- [Sept and McCammon, 2001] Sept, D. and McCammon, J. a. (2001). Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophysical journal*, 81(2) :667–674.
- [Sheetz et al., 1990] Sheetz, M. P., Baumrind, N. L., Wayne, D. B., and Pearlman, A. L. (1990). Concentration of membrane antigens by forward transport and trapping in neuronal growth cones. *Cell*, 61(2) :231–241.
- [Shull et al., 1998] Shull, K. R., Ahn, D., Chen, W.-L., Flanigan, C. M., and Crosby, A. J. (1998). Axisymmetric adhesion tests of soft materials. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 199(4) :489–511.
- [Silacci et al., 2004] Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L., and Hayoz, D. (2004). Gelsolin superfamily proteins : Key regulators of cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19-20) :2614–2623.

- [Sokolov, 2007] Sokolov, I. (2007). Atomic force microscopy in cancer cell research. *Cancer Nanotechnology*, 1 :1–17.
- [Steketee and Tosney, 2002] Steketee, M. B. and Tosney, K. W. (2002). Three functionally distinct adhesions in filopodia : shaft adhesions control lamellar extension. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(18) :8071–8083.
- [Stockem et al., 1982] Stockem, W., Hoffmann, H.-U., and Gawlitta, W. (1982). Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*. *Cell and Tissue Research*, 221(3) :505–519.
- [Storm et al., 2005] Storm, C., Pastore, J. J., MacKintosh, F. C., Lubensky, T. C., and Janmey, P. A. (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature*, 435(7039) :191–194.
- [Suarez et al., 2011] Suarez, C., Roland, J., Boujemaa-Paterski, R., Kang, H., McCullough, B. R., Reymann, A. C., Guérin, C., Martiel, J. L., De La Cruz, E. M., and Blanchoin, L. (2011). Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Current Biology*, 21(10) :862–868.
- [Suh et al., 2012] Suh, S. K., Yuet, K., Hwang, D. K., Bong, K. W., Doyle, P. S., and Hatton, T. A. (2012). Synthesis of nonspherical superparamagnetic particles : In situ coprecipitation of magnetic nanoparticles in microgels prepared by stop-flow lithography. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17) :7337–7343.
- [Suresh, 2007] Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta biomaterialia*, 3(4) :413–38.
- [Suter et al., 2011] Suter, M., Ergeneman, O., Zürcher, J., Schmid, S., Camenzind, a., Nelson, B. J., and Hierold, C. (2011). Superparamagnetic photocurable nanocomposite for the fabrication of microcantilevers. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21(2) :025023.
- [Svitkina and Borisy, 1999] Svitkina, T. M. and Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *Journal of Cell Biology*, 145(5) :1009–1026.
- [Svitkina et al., 1997] Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., McQuade, K. M., and Borisy, G. G. (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes : Mechanism of cell body translocation. *Journal of Cell Biology*, 139(2) :397–415.
- [Sweeney and Houdusse, 2010] Sweeney, H. L. and Houdusse, A. (2010). Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism. *Annual Review of Biophysics*, 39(1) :539–557.
- [Tavacoli et al., 2013] Tavacoli, J. W., Bauër, P., Fermigier, M., Bartolo, D., Heuvingh, J., and du Roure, O. (2013). The fabrication and directed self-assembly of micron-sized superparamagnetic non-spherical particles. *Soft Matter*, 9(38) :9103–9110.
- [Tharmann et al., 2007] Tharmann, R., Claessens, M. M. a. E., and Bausch, a. R. (2007). Viscoelasticity of isotropically cross-linked actin networks. *Physical Review Letters*, 98(8) :8–11.
- [Theriot, 2000] Theriot, J. a. (2000). The polymerization motor. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 1(1) :19–28.

- [Theriot and Mitchison, 1991] Theriot, J. a. and Mitchison, T. J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells.
- [Thoumine and Ott, 1997] Thoumine, O. and Ott, a. (1997). Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of cell science*, 110 (Pt 1 :2109–2116.
- [Thoumine et al., 1999] Thoumine, O., Ott, A., Cardoso, O., and Meister, J. J. (1999). Microplates : A new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 39(1-2) :47–62.
- [Tilney and Portnoy, 1989] Tilney, L. G. and Portnoy, D. a. (1989). Actin Filaments and the Growth, Movement, and Spread of the Intracellular Bacterial Parsite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.*, 109(October) :1597–1608.
- [Tseng et al., 2012] Tseng, P., Judy, J. W., and Di Carlo, D. (2012). Magnetic nanoparticle-mediated massively parallel mechanical modulation of single-cell behavior. *Nature Methods*.
- [van der Gucht et al., 2005] van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22) :7847–7852.
- [Vavylonis et al., 2006] Vavylonis, D., Kovar, D. R., O’Shaughnessy, B., and Pollard, T. D. (2006). Model of Formin-Associated Actin Filament Elongation. *Molecular Cell*, 21(4) :455–466.
- [Veigel and Schmidt, 2011] Veigel, C. and Schmidt, C. F. (2011). Moving into the cell : single-molecule studies of molecular motors in complex environments. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(3) :163–176.
- [Wegner, 1976] Wegner, a. (1976). Head to tail polymerization of actin. *Journal of molecular biology*, 108(1) :139–150.
- [Wegner and Engel, 1975] Wegner, a. and Engel, J. (1975). Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophysical Chemistry*, 3(3) :215–225.
- [Wen et al., 2012] Wen, Q., Basu, A., Janmey, P. a., and Yodh, A. G. (2012). Non-affine deformations in polymer hydrogels. *Soft Matter*, 8(31) :8039.
- [Wiche, 1998] Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *Journal of cell science*, 111 (Pt 1 :2477–2486.
- [Wiesner et al., 2003] Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (2003). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, 160(3) :387–398.
- [Xu et al., 2000] Xu, J., Tseng, Y., and Wirtz, D. (2000). Strain hardening of actin filament networks : Regulation by the dynamic cross-linking protein α -actinin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46) :35886–35892.
- [Xu et al., 1998] Xu, J., Wirtz, D., and Pollard, T. D. (1998). Dynamic cross-linking by alpha-actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *J. Biol. Chem.*, 273(16) :9570–9576.

- [Yarmola and Bubb, 2006] Yarmola, E. G. and Bubb, M. R. (2006). Profilin : emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(4) :197–205.
- [Yuan et al., 2000] Yuan, H., Kononov, S., Cavalcante, F. S., Lutchen, K. R., Ingenito, E. P., and Suki, B. (2000). Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 89(1) :3–14.
- [Yuan et al., 2003] Yuan, X.-b., Jin, M., Xu, X., Song, Y.-q., Wu, C.-p., Poo, M.-m., and Duan, S. (2003). Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol*, 5(1) :38–45.

Annexe A

Concentration des tampons

Tampon	espèce	concentration (mM)
ATP mix		
	ATP	12
	DTT	40
	Dabco	0.9
TPX		
	Hepes	10
	KCl	100
	CaCl ₂	0.1
	MgCl ₂	10
TPG		
	Tris	5
	CaCl ₂	0.2
KME (x20)		
	KCl	2000
	MgCl ₂	20
	EGTA	4

Annexe B

Caractérisation des billes superparamagnétiques Ademtech

Les billes superparamagnétiques sont composées de milliers de grains ferromagnétiques dans une matrice non-magnétique. Les billes Ademtech que nous utilisons sont composées d'un ensemble de grains d'oxyde de fer (magnétite Fe_3O_4) dans une matrice de polystyrène biocompatible. La magnétite est un matériau ferrimagnétique, mais à cause de la petite taille des grains, les billes ont un comportement superparamagnétique. D'après les spécifications du fabricant, le nombre de grains d'oxyde de fer par bille est de l'ordre de 10^4 - 10^5 , la taille des grains varie entre 5 et 15 nm, et le diamètre externe est de $300 \text{ nm} \pm 10\%$ (figure B.1).

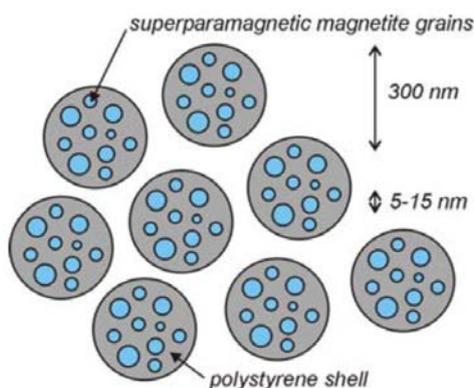


FIGURE B.1 – Schéma des billes superparamagnétiques Ademtech. D'après [Ommering, 2006].

Pour vérifier ces spécifications, [Ommering, 2006] ont fait des images en microscopie électronique d'échantillons de billes (voir figure B.2). On peut voir sur la figure B.2.a environ 40 billes avec une grande distribution de tailles. La figure B.2.b zoome sur quelques billes, faisant ressortir le polystyrène en gris et les grains d'oxyde de fer en noir. L'épaisseur de la coque de polymère est de 20-30 nm. On voit sur la figure B.2.c que la distribution des grains n'est pas toujours homogène à l'intérieur des billes.

A partir de l'image B.2.a les tailles des billes sont déterminées. L'histogramme de la figure

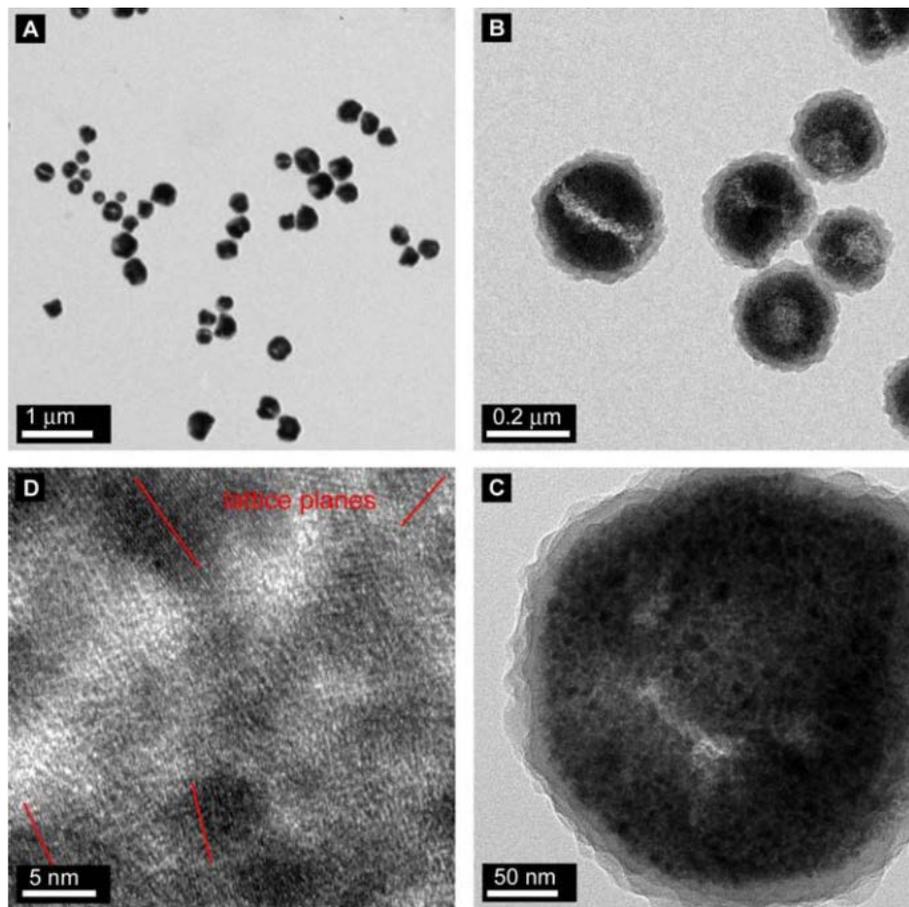


FIGURE B.2 – Images de microscopie électronique des billes Ademtech à différents grossissements. D'après [Ommering, 2006].

B.3 montre une distribution des tailles de billes plus large que les spécifications données par le fabricant.

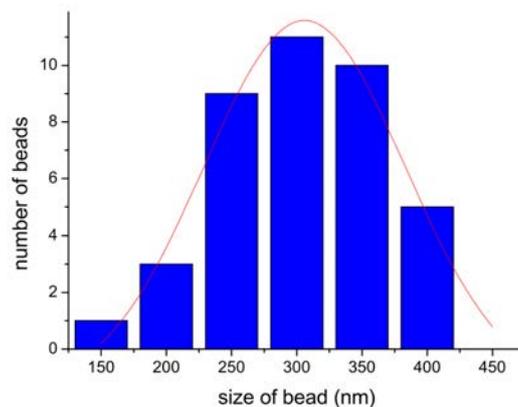


FIGURE B.3 – Histogramme de la distribution de taille des billes Ademtech de la figure B.2 (total de 41 billes). Le diamètre moyen est de 300 nm, la largeur à mi-hauteur est de 150 nm. D'après [Ommering, 2006].

Annexe C

Estimation de la courbure de la surface des cylindres et conséquences sur la force magnétique

Afin d'estimer le creux des cylindres, on mesure de combien s'enfonce une bille MOnes au centre de la face creusée par rapport au bord (voir section 3.6.2). Pour les 17 mesures effectuées, on a ainsi un creux de 5,64 px, soit 0,36 μm , avec un écart type de 2,23 px. En prenant un diamètre de creux de 5 μm , on obtient un rayon de courbure de 8,84 μm après résolution géométrique.

Nous avons tenu compte de ces caractéristiques dans les simulations par éléments finis. Nous avons tracé en figure C.1 les résultats obtenus pour les différentes situations possibles.

Pour chaque liaison sondée nous adaptons le calcul de la force en conséquence selon quels côtés des cylindres sont face à face.

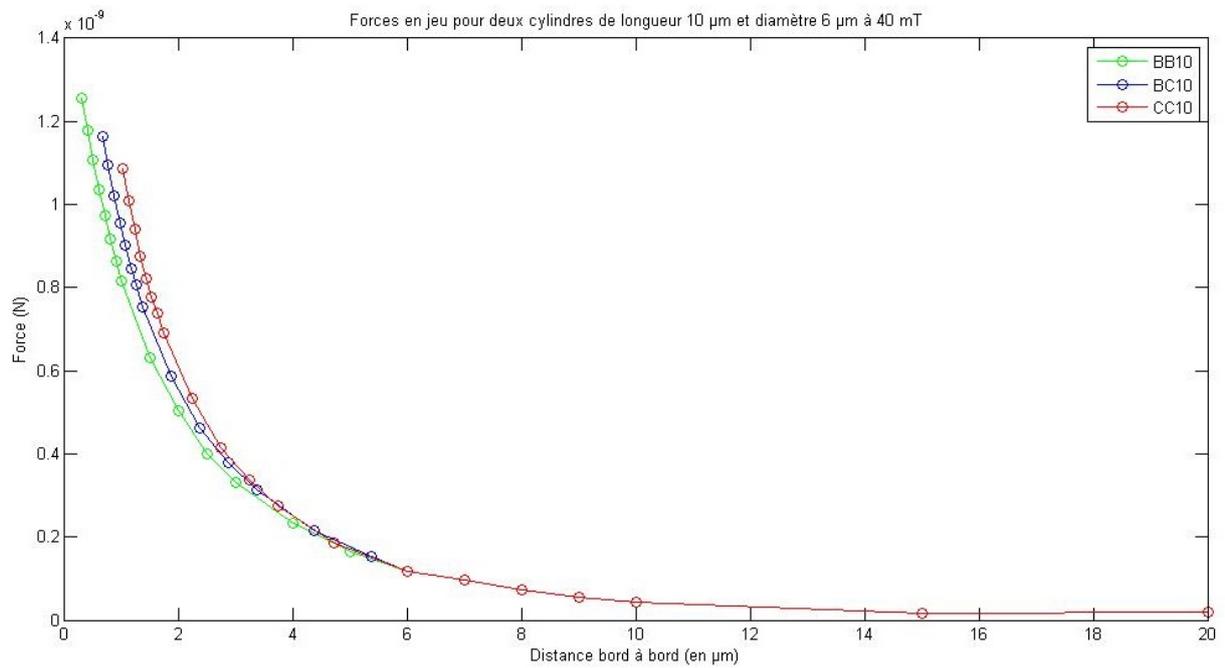


FIGURE C.1 – Évolution de la force en fonction de la distance entre deux cylindres de diamètre 6 μm et de longueur 10 μm, pour un champ de 40 mT. Les courbes correspondent aux différents cas possibles. BB : deux faces bombées face à face. BC : face bombée contre face creuse. CC : deux faces creuses face à face.

Annexe D

Evolution du module élastique en fonction de la contrainte pour différentes concentrations en Arp2/3

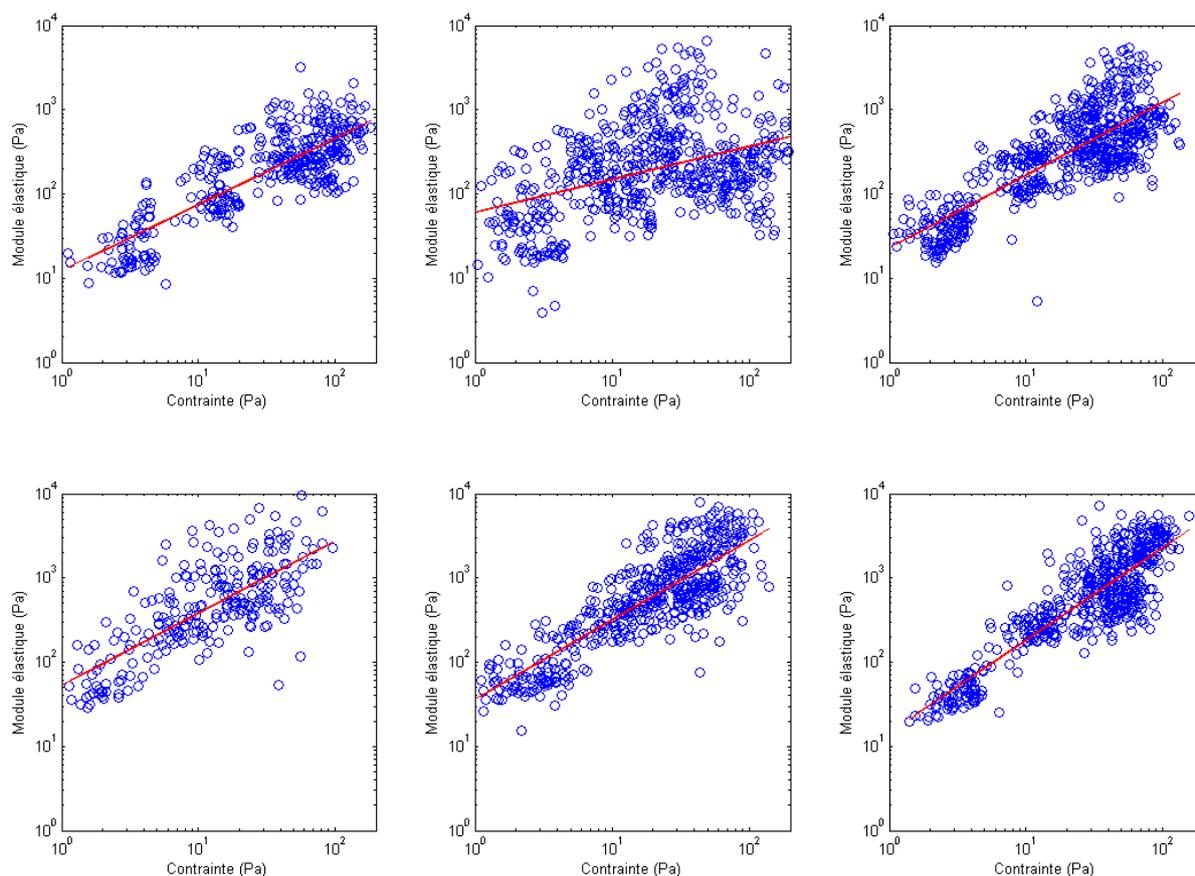


FIGURE D.1 – Évolution du module élastique à 50 Pa en fonction de l'intensité de fluorescence pour différentes concentrations en Arp2/3. Dans le sens de la lecture : $[\text{Arp2/3}] = 10 \text{ nM}, 20 \text{ nM}, 30 \text{ nM}, 50 \text{ nM}, 100 \text{ nM}$ et 180 nM .

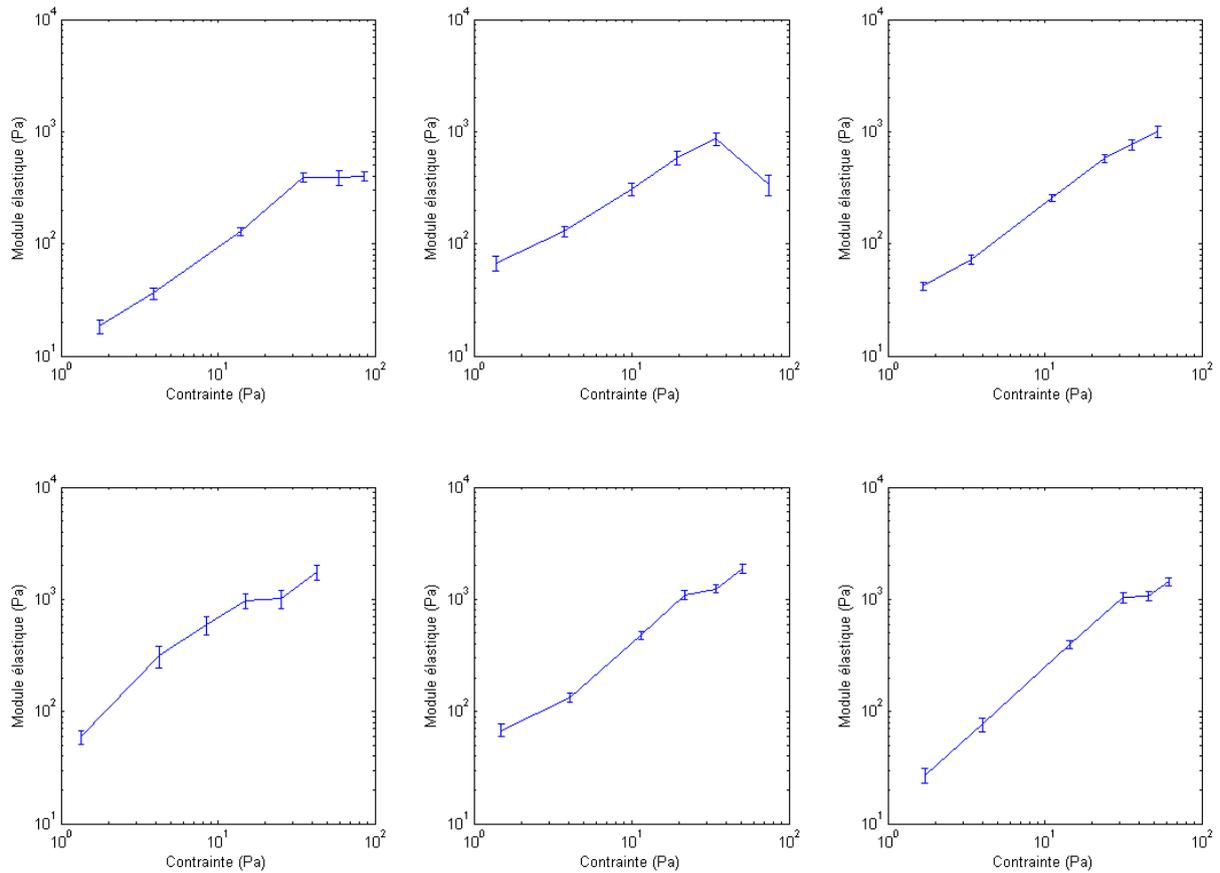


FIGURE D.2 – Évolution du module élastique moyenné à 50 Pa en fonction de l'intensité de fluorescence pour différentes concentrations en Arp2/3. Dans le sens de la lecture : [Arp2/3]=10 nM, 20 nM, 30 nM, 50 nM, 100 nM et 180 nM.

Annexe E

Étude mécanique des cellules

La technique permettant de créer des formes superparamagnétiques de tailles et de géométries contrôlées peut avoir plusieurs applications, notamment pour l'étude de la mécanique des cellules. L'idée développée dans ce chapitre est de venir indenter plusieurs cellules cultivées sur des blocs superparamagnétiques en même temps. La section E.2 est consacrée à l'utilisation de cette technique pour l'étude mécanique des cellules.

E.1 Contexte

On a vu en section 2.1 différentes méthodes pour faire des mesures de mécanique sur des cellules. Ces techniques sont en général difficiles à mettre en oeuvre, sont longues, et présentent l'inconvénient de ne pouvoir sonder qu'une seule cellule à la fois. Or, pour certaines applications, il peut être intéressant de pouvoir sonder la mécanique de plusieurs cellules en même temps afin d'accélérer le débit des mesures et d'avoir de plus grandes statistiques, ou d'observer par exemple la propagation d'un signal spatio-temporel entre elles. Un exemple de ce dernier cas peut être l'étude de l'approche d'un globule blanc sur un tapis de cellules endothéliales dans le contexte de l'athérosclérose (voir figure E.1). Des techniques comme l'AFM par exemple ne permettent d'indenter qu'une seule cellule à la fois et n'autorisent l'introduction d'aucun autre outil comme une micropipette pouvant permettre de contrôler le contact avec un globule blanc.

E.2 Détermination des propriétés mécaniques des cellules

Nous fabriquons des pavés ($150 \times 100 \times 50 \mu\text{m}$) et des cylindres (diamètre $6 \mu\text{m}$, longueur $10 \mu\text{m}$) magnétiques grâce à la technique développée en section 3.3.1. Des cellules sont cultivées sur les pavés placés au fond d'une boîte de Petri contenant un grand volume de milieu de culture ce qui permet de réaliser des expériences sur plusieurs heures. Les cellules présentes sur la tranche du pavé sont observées de profil au microscope optique. Une fois les cylindres injectés dans la boîte de Pétri, un champ magnétique est appliqué (voir figure E.3). En adaptant la quantité de cylindres injectés, il est possible d'obtenir un ou plusieurs cylindres en contact avec chacune des cellules de la monocouche.

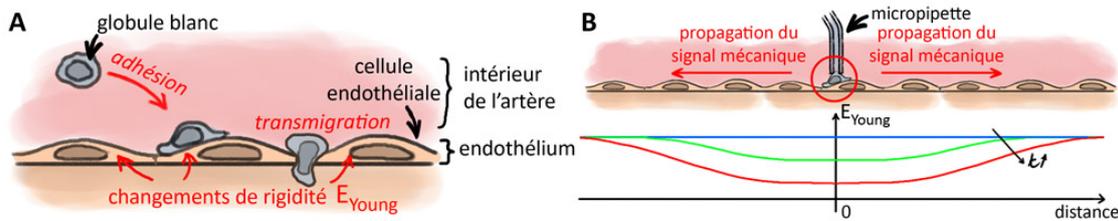


FIGURE E.1 – l’adhésion d’un globule blanc à l’endothélium, une monocouche de cellules endothéliales tapissant la paroi des artères, provoque des changements de rigidité cellulaire (quantifié en termes de module d’Young) dans les cellules endothéliales avoisinantes. Ceci permet au globule blanc de migrer entre les cellules endothéliales B : le projet proposé vise à quantifier la propagation spatio-temporelle du signal mécanique (un ramollissement se traduisant par une variation du module d’Young) dans l’endothélium suite au contact entre une cellule endothéliale choisie et un globule blanc approché par une micropipette

L’application d’un champ magnétique contrôlé et dépendant du temps permet d’indenter les cellules et ainsi de mesurer leurs propriétés mécaniques. La force appliquée dépend de la distance entre le cylindre et le pavé et est calculée par la méthode des éléments finis. La distance entre le cylindre et le pavé lors de l’indentation est mesurée par corrélation d’images. Nous obtenons la relation contrainte-déformation de chaque cellule, permettant d’accéder à leurs propriétés mécaniques.

Nous avons fait deux séries d’expériences : une en collaboration avec Julien Husson et Avin Babataheri du laboratoire LadHyX de l’Ecole Polytechnique sur des cellules endothéliales, et une autre pour un projet expérimental d’étudiants de l’ESPCI ParisTech sur des cellules Hela et sur des cellules épithéliales. Nous rencontrons actuellement quelques problèmes expérimentaux, car les pavés magnétiques étant scellés au fond d’une boîte de pétri, il y a un mouvement global de l’ensemble du système dû à un mouvement de la platine grand devant le mouvement relatif des cylindres et des blocs.

Conclusion : Ces expériences préliminaires sont très encourageantes pour développer cette nouvelle technique de mesure des propriétés mécaniques des cellules dans l’espace et dans le temps. Beaucoup de perspectives d’analyse des propriétés mécaniques des cellules s’ouvrent grâce à cette technique. Une fois les différents types cellulaires entièrement caractérisés, on pourra possiblement appliquer cette technique au domaine médical, de manière à facilement discriminer cellules saines et cancéreuses par exemple. De plus, ce système pourra également servir à étudier l’effet de drogues sur le cytosquelette, et à observer les réarrangements qui ont lieu pendant la compression.

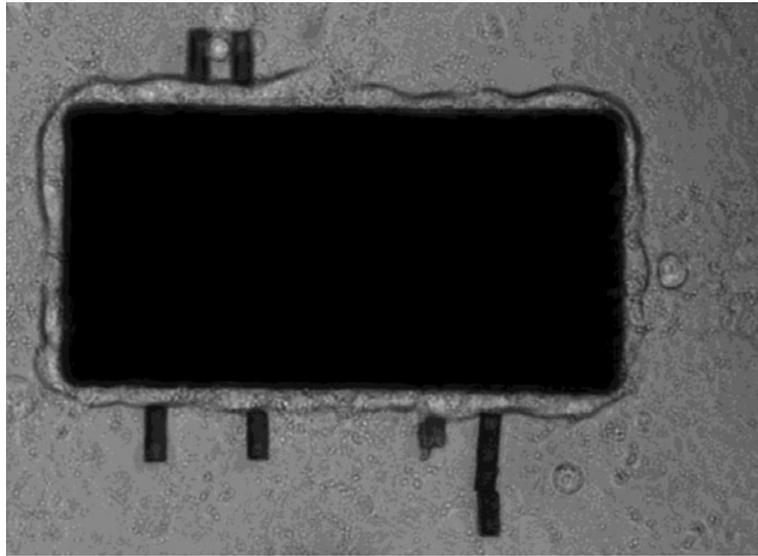


FIGURE E.2 – Un bloc superparamagnétique de $150 \times 100 \times 50 \mu\text{m}$ vu de haut sur lequel ont été cultivées des cellules. Des cylindres de $6 \mu\text{m}$ de diamètre permettent de venir indenter les cellules en faisant varier le champ magnétique.

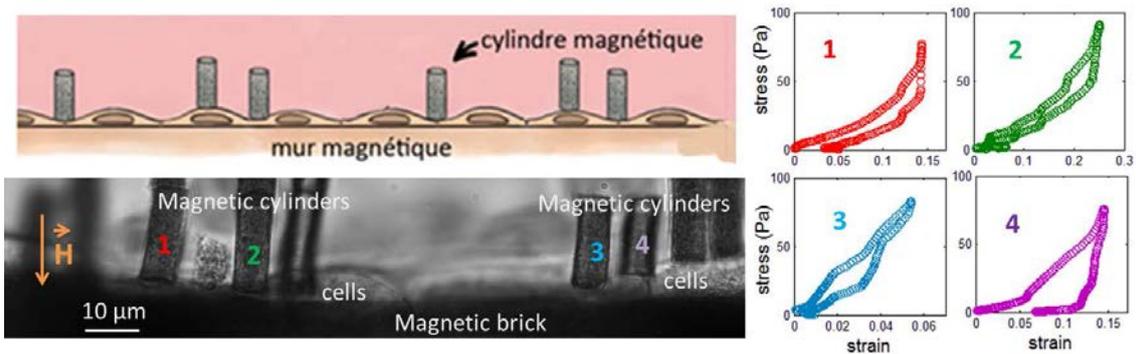


FIGURE E.3 – Gauche : Schéma (en haut) et réalisation d'une expérience. Image en microscopie optique (en bas) d'un pavé magnétique recouvert de cellules endothéliales indentées par des cylindres magnétiques. Droite : Courbes contrainte-déformation pour les cellules indentées par les cylindres notés 1 à 4 obtenues en appliquant un champ croissant puis décroissant. Le module varie de 500 Pa à 2 kPa pour ces exemples.

Annexe F

Publication

The fabrication and directed self-assembly of micron-sized superparamagnetic non-spherical particles†

Cite this: DOI: 10.1039/c3sm51589c

Joe W. Tavacoli,* Pierre Bauër, Marc Fermigier, Denis Bartolo, Julien Heuvingsh* and Olivia du Roure

Received 7th June 2013

Accepted 9th July 2013

DOI: 10.1039/c3sm51589c

www.rsc.org/softmatter

We outline a simple technique to engineer monodisperse, superparamagnetic, micron-sized prisms of arbitrary cross-section and large magnetic susceptibility. The fabrication process allows pre-positioning of the particles that introduces another lever to guide self-assembly. In this method, a dispersion of magnetic colloids in a UV-curable monomer is molded in PDMS wells and subsequently reticulated. High homogeneous magnetic content is achieved by preventing colloidal aggregation through careful choice of the colloid and monomer. Additionally, on their removal from the PDMS molds, the relative position of the magnetic particles is conserved: they are extracted as arrays whose patterns are set by the PDMS mold. This novel method therefore offers unique control of the self-assembly of specific 'higher order' structures mediated by dipolar interactions and directed by the geometry and initial positioning of the particles. This is also a promising approach to develop devices with complex responses to external fields.

Superparamagnetic micron-sized spheres have led to a whole host of applications and advancements,¹ for example in the isolation and purification of proteins,^{2,3} the fabrication of magnetically responsive colloidal photonic crystals⁴ and Pickering emulsions,⁵ the assembly of micro-swimmers⁶ and the development of new techniques to access mechanical properties of cytoskeleton networks.⁷ Magnetic particles with shape anisotropy offer broader potential than spherical counterparts;^{8–13} they allow the formation of complex structures and are of prime interest for their applications in life and materials sciences.^{14–19} Upon application of a homogeneous magnetic field, magnetic particles with anisotropic shapes align along their longest axis, providing the possibility to remotely control their orientation and their self-assembly into complex

structures. Superparamagnetic particles provide additional routes to self-assembly^{8,14} because interactions among particles can be switched on and off upon application and removal of the magnetic field.

One method to ally geometric control of the shape and superparamagnetism is to apply lithography techniques to UV/heat responsive resins and dope the latter with iron oxide nanoparticles.^{10,12,20} In such a way, magnetic particles of desired geometry can be fabricated. However, *superparamagnetic* polymeric composites generated in this fashion tend to have a low magnetic susceptibility: the propensity of the nano-particles to aggregate at low volume fractions in most suitable resins prevents homogeneous doping as well as good control of the shapes at the micron scale.¹² A further complication comes from the absorption of UV light by nanoparticles that reduces the homogeneity of the reticulation process. For all these reasons it is still challenging to obtain particles with controlled shape and amount of magnetic content above 10% w/w. Kyung Suh *et al.* have developed an elegant procedure in which the nanoparticles are synthesized *in situ* after design of the particles.²⁰ This allows higher magnetic contents but sizes below 100 microns have not been reported. In addition, harvesting molded particles is also a delicate step.²¹

We describe in this letter a novel method that breaks through these limitations and allows the synthesis and easy harvesting of superparamagnetic, monodisperse, sub-5 micron arbitrary-shaped prisms or cylinders with the magnetic content as high as 50% w/w. We load a mixture of the monomer ethoxylated trimethylolpropanetriacrylate (ETPTA) and 300 nm diameter silica-coated superparamagnetic colloids²² (Adem-beads) into micron-sized PDMS wells and then reticulate the monomer with UV light (Fig. 1a). Monodispersity and morphological-control are obtained by use of lithography techniques: the size and shape of the features are controlled by the dimensions of the PDMS mold. The cross-section resolution is directly the resolution of the lithography through the chromium mask (here, 1 μm). The height of the prisms is set by the depth of the PDMS wells and can vary between one and few tens

Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, UMR 7636 CNRS/ESPCI/UPMC/Paris Diderot, 10 Rue Vauquelin, 75005, Paris, France. E-mail: joseph.tavacoli@espci.fr; julien.heuvingsh.espci.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3sm51589c

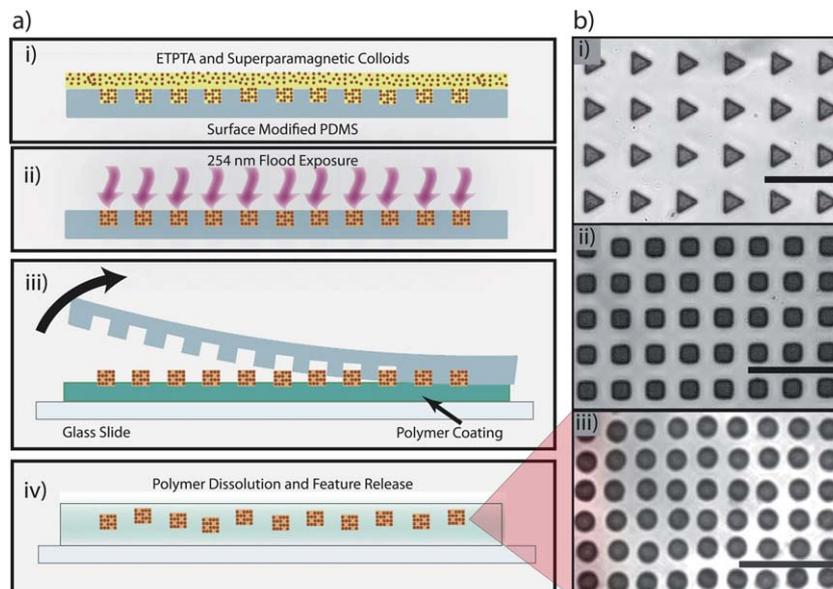


Fig. 1 Particle fabrication. (a) The fabrication process. (i) A dispersion of silica-covered superparamagnetic colloids in ETPTA and photoinitiator is loaded into PDMS 'wells' of the required shape. (ii) After cleaning of the PDMS surface, the dispersion is reticulated with 254 nm light. (iii) Extraction takes place by waxing the particles from the mold with a polymer. (iv) Dissolution of the polymer allows release of the particles and the pattern of the particles is maintained. (b) Bright field microscope images of a selection of extracted superparamagnetic particles in regular arrays. (i and ii) Arrays embedded in a waxing polymer. (iii) Superparamagnetic cylinders with a circular cross-section released from the extracting polymer. Retention of the array is evident in this image. The scale bar is 40 μm .

of microns. As for all molding methods, features with high aspect ratios (typically width/height larger than 1 : 6) are difficult to extract. To emphasize the range of shapes and sizes that are achievable with our technique, we show in Fig. 2 and 3 particles of different geometries, from stars to triangles, and different dimensions. A slight modification of our protocol

allows the fabrication of Janus particles of which only a section is superparamagnetic (Fig. 3).

To reduce van der Waals interactions and thus preserve colloidal stability up to high volume fraction (50%) we carefully selected a pairing of photosensitive monomer (*i.e.*, ETPTA) and colloid surface (*i.e.*, silica-coated).²³ This allows close-packing of

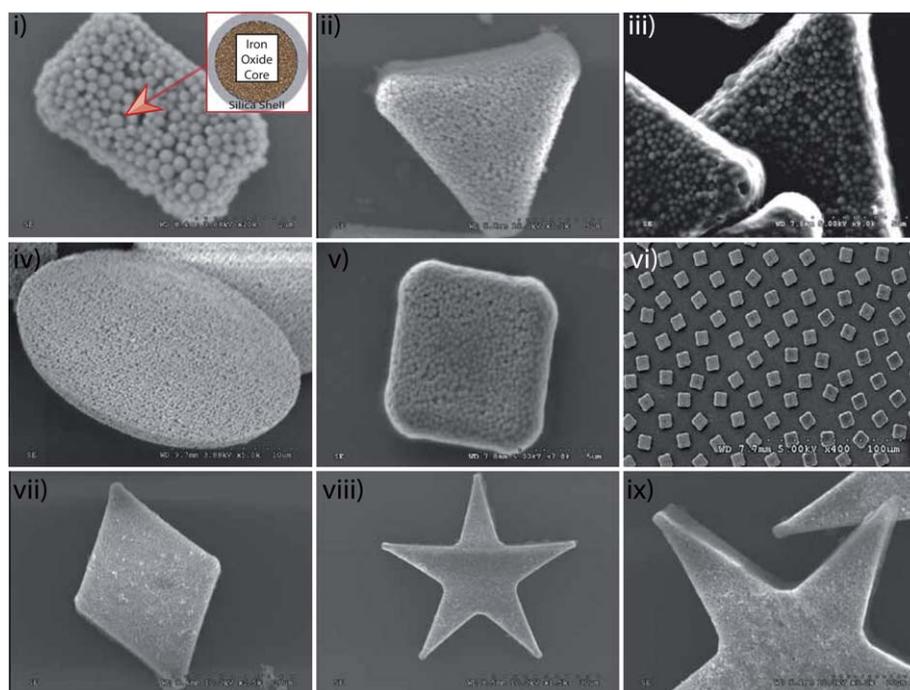


Fig. 2 Scanning electron microscope images of the particles. (i)–(ix) A range of geometries. In (i)–(v) the close-packed 300 nm superparamagnetic colloids can be clearly seen within the ETPTA polymer matrix. In (iii) and (ix) the topology of feature sides can be seen which displays nano-scale roughness.

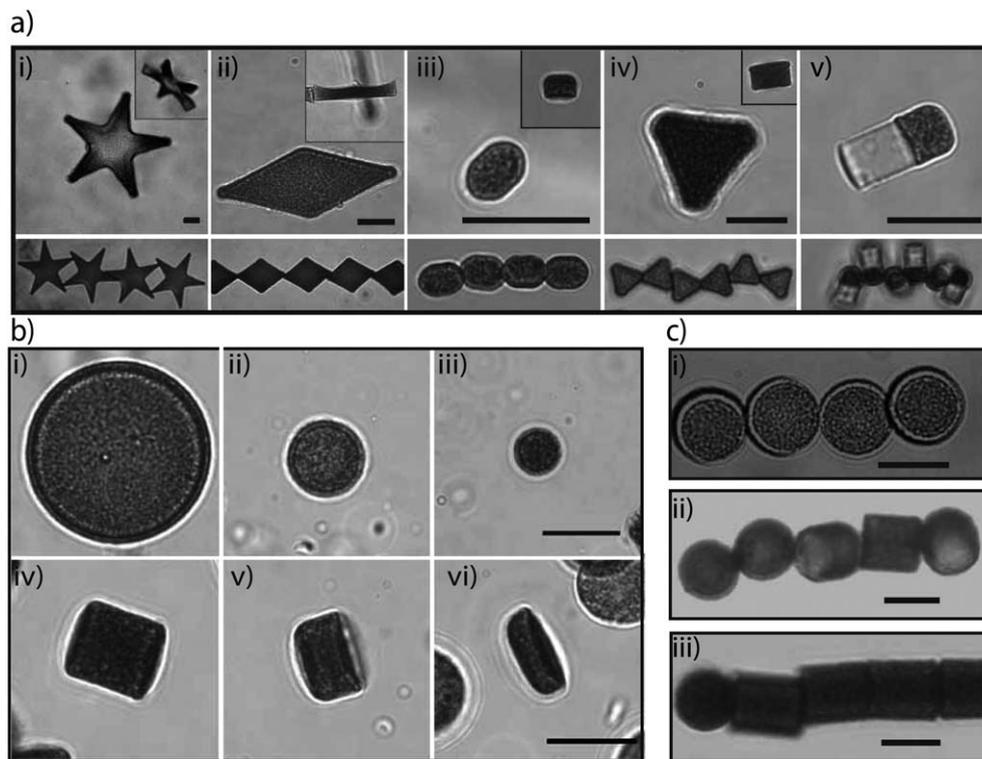


Fig. 3 Control over the geometry and dimensions of the superparamagnetic particles. (a) A selection of particles (upper panel) and their chaining under a homogeneous field (lower panel). On application of a magnetic field, the particles chain with their longest dimension aligned with the field (longest dimension of their superparamagnetic dimension in the case of the Janus cylinders, panel v). (b) Superparamagnetic cylinders with a circular cross-section: (i) to (iii) decreasing diameters (25, 10 and 6 μm); (iv) to (vi) decreasing depths (7.5, 5 and 2 μm , with a fixed diameter of 10 μm). (c) Altering the depth of cylinders affects the chaining character as the longest dimension shifts from width to depth. Scale bars are 10 μm .

the silica colloids within our particles as illustrated by the SEM images (Fig. 2). Hence our particles contain, homogeneously distributed, 45% w/w magnetic content, which is far more than that previously achieved *via* this type of approach.^{10,12,24} Using magnetization data on the superparamagnetic colloids,²⁵ we deduce a nominal volume susceptibility of 0.63 – linear up to 10 mT, a saturation magnetization of $4 \times 10^4 \text{ A m}^{-1}$ and a magnetization of $1.6 \times 10^4 \text{ A m}^{-1}$ at 40 mT. These values are comparable to those of high-end commercial beads.²⁶ We verified the magnetization values by measuring the speed of cylindrical particles moving due to a magnetic field gradient at different field intensities. The magnetic force calculated with the nominal magnetization corresponds very well to the force opposing the Stokes drag force on the particles moving through water (see Fig. 4). We deduce from these measurements a discrepancy between the nominal and true values of magnetization of $4\% \pm 3\%$.

Because in our method the shape is imposed by the PDMS wells and not by UV-exposure through a mask, we ensure homogeneity of the reticulation and avoid the resolution limitation arising from the absorption of UV light by iron-oxide colloids. The reticulated particles are extracted and harvested from the molds *via* a ‘waxing’ technique using the polymer poly(1-vinyl-pyrrolidone-*co*-vinylacetate) (P(VP-VA)). They can be released from the P(VP-VA) by dissolution of the copolymer in iso-propanol or ethanol. After release and in the absence of

mechanical agitation, the extracted particles maintain the same relative positions as in the mold (Fig. 1b), a situation that offers a great control of their positioning upon application of the field.

On application of a homogeneous magnetic field the synthesized particles self-assemble into chains (Fig. 3). The three-dimensional shape of the particles is of prime importance to determine their organization. More precisely particles with a single long axis rotate to align this axis with the field – leading to chaining in the direction of the field. For example, cylinders with a circular cross-section whose height is smaller than their diameter self-organize into a necklace-structure (see Fig. 3c-i), whereas the cylinders whose height is larger than their diameter self-organize into a long rod (Fig. 3c-iii). For circular cylinders whose dimensions are all similar there is no preferred orientation in the chain (Fig. 3c-ii). In self-organized chains, thin prisms whose cross-sections are diamonds, ovals, and rectangles have their longest axes aligned within chains (see Fig. 3a-ii and iii). Contrarily, thin prisms whose cross-sections are equilateral triangles, stars or squares displayed heterogeneous chaining contacts, comparable to the chaining obtained with circular cylinders whose dimensions are all similar (Fig. 3). The above observations are consistent with 2D numerical simulations performed with the finite element method to calculate the lowest-energy orientation of isolated particles in a field (Fig. 5a and ESI, S1†). Our simulations also show that the magnetic energies of equilateral triangles, squares and stars are

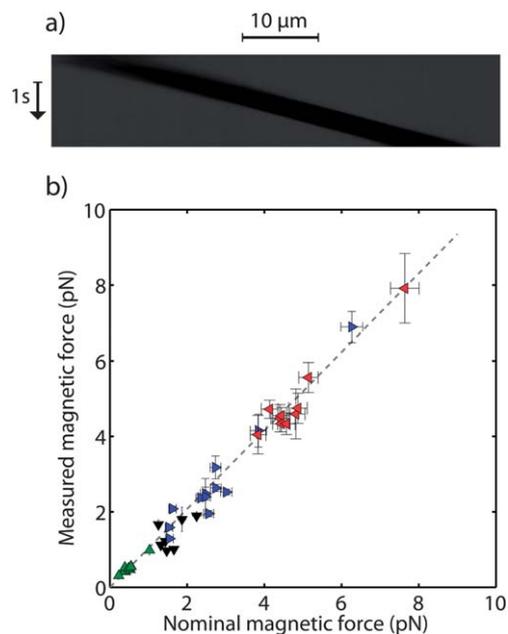


Fig. 4 Measurement of the magnetization. (a) Kymograph extracted from a film of a superparamagnetic cylinder moving in a field gradient of 0.746 T m^{-1} (field: 20 mT). Blurring is due to the sedimentation of the particle. The gradient is oriented towards the right and the time towards the bottom of the image. (b) Plot of the nominal magnetic force as a function of the measured magnetic force extracted from the velocity of cylinders (diameter: $4.5\text{--}7 \mu\text{m}$, length: $7\text{--}18 \mu\text{m}$) moving in a field gradient at different field intensities (triangle pointing upward: 10 mT, downward: 20 mT, right: 30 mT, left: 40 mT color online). Error bars are computed from the uncertainty in the speed and volume of the cylinders. The dashed line is a linear fit whose slope is 1.04.

independent of the direction of the field. Experimental results confirm these results, showing that these shapes, when isolated, have no preferred orientation with respect to the field. Thus, by enabling tight control of particle dimensions, our technique allows for tight control of the nature of chaining.

To gain insights into the first step of self-assembly we studied the dimerization of released and randomly oriented particles. We focused on triangles because they have no preferred orientation in a field despite their geometrical anisotropy. We performed experiments in which particles lost their relative positioning and orientation prior to the application of the field. In this situation, equilateral triangles form dimers whose configuration is not random but largely dominated by tip-to-tip (72% of dimers) (as compared to tip-to-side, 19%, and side-to-side, 9%, number of dimers = 48). In addition, we calculated the magnetic energy of adjacent triangles independently rotated in the range $[-60, 60^\circ]$ around their center of gravity (details of the calculation are given in the ESI, S1†) to obtain an energy landscape (Fig. 5b). The lowest energy conformation is tip-to-tip aligned with the field ($\theta_1 = 0^\circ$, $\theta_2 = 0^\circ$). Centered on this conformation, the energy landscape can be broadly partitioned into two regions: one, surrounding the tip-to-tip conformation in the center of the map (light blue and within) where the gradient is strong, and another one, with a lower gradient, outside of the former. By superimposing the shapes of approaching triangles, extracted from experimental

images, on the energy landscape (Fig. 5b-i-iv) we find that tip-to-tip contacts occur when triangles approach within the high-gradient region and tip-to-side and side-to-side contacts when triangles approach the low-gradient region. Thus our experimental results are in agreement with the simple idea that when the gradient is large enough the particles reach a lower energy state before contact, and when the gradient is smaller the particles only slightly rotate before they meet. The energy landscape also explains the relative lack of abundance of tip-to-side and side-to-side contacts as these configurations occur only when triangles *happen* to converge in such a way. These rich patterns of self-assembly demonstrate the potential of non-spherical magnetic shapes to build complex structures.

Further control of self-assembly is given by the regular pre-field arrangements of the particles. Here, the self-organization is studied on dissolution of the polymer and immediate application of the field (to preserve initial positioning of the particles). Fig. 6 shows a collection of thin cylinders, extracted as a regular square array, subjected to a field aligned with one direction of the array. At short times, a regular face-centered square lattice of dimers forms. This conformation minimizes the superimposition perpendicular to the field and therefore the repulsive dipole-dipole interactions. This result is in agreement with the calculation of the energy (see the ESI, S4†). At intermediate times trimers form and at the longest times oligomers assemble into long chains (see the ESI, Movie S3†). Thus, the time under field is a control parameter of the assembly allowing one to choose among dimers, oligomers and long chains. This principle could be easily extended to the assembly of more complex structures made from particles of different shapes. The advantage of this type of assembly over direct fabrication with lithography is in its capacity to produce structures that have degrees of freedom introduced by the relative motion of the elementary components of the whole structure. For instance, superparamagnetic swimmers, which depend on their bending modes to swim, could in principle be self-assembled on the application of a homogeneous magnetic field and actuated by a time-dependent field.^{27,28}

By combining shape anisotropy and pre-positioning we show that we can tune the character of contacts formed within a chain. An example of this is given by the array of thin square prisms shown in Fig. 6b. In a random starting orientation these particles self-assemble into disorganized chains. However, when these particles are positioned in an array, the assembled structures depend on the relative orientation of the field with respect to the direction of the array. Surprisingly, 0 and 45° lead to the same side-to-side structure, whereas an intermediate value results in disorganized chains (Fig. 6b). That side-to-side contacts are abundant at 0° is intuitive; the particles are already aligned close together in this conformation before application of the field. The organization for 45° is presumably the result of interactions with adjacent and vertically spaced particles (ESI, Movie S5†). Hence, even with our simple square arrays we have introduced a new type of geometrical anisotropy – that of relative position of the particles with respect to the field – and have shown how it can guide field-induced self-assembly. We stress

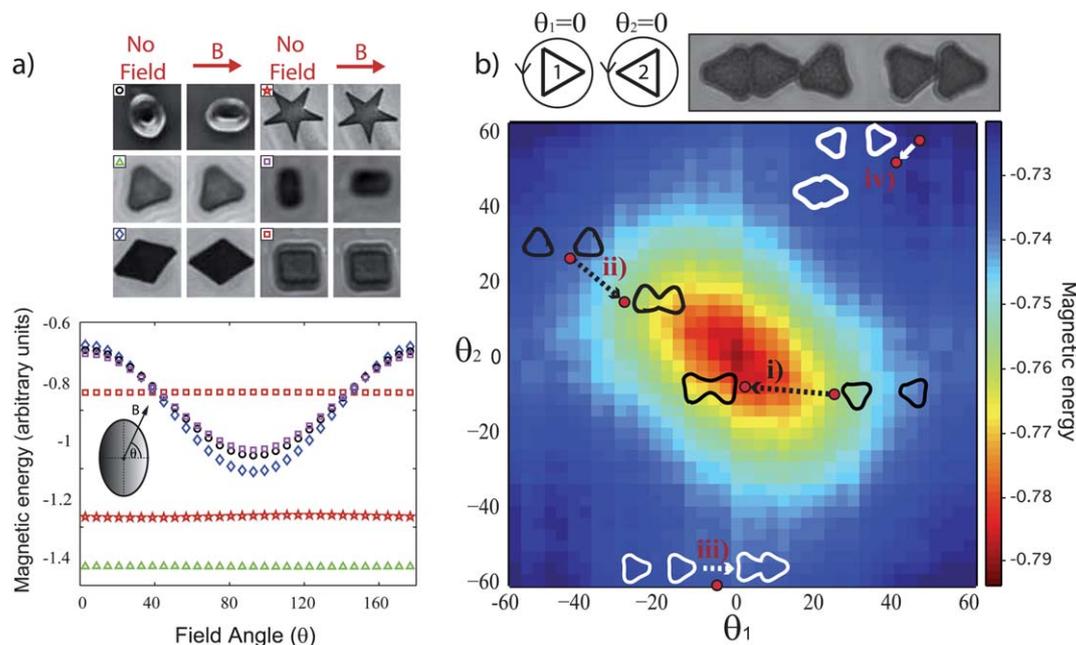


Fig. 5 Finite element simulations. (a) Calculation of the magnetic energy of a range of 2D shapes with respect to field angle (lower panel). Here, the minima of the magnetic energies of shapes with a single long dimension – diamonds (\diamond), rectangles (\square), ovals (o) – correspond to the alignment of this dimension to the field, whereas the magnetic energies of shapes with no single long dimensions – squares (\square), equilateral triangles (Δ) and pentagrams ($*$) – are independent of the field direction. These calculations are consistent with experimental results on thin prisms of corresponding cross-sections (upper panel). (b) Magnetic energy (arbitrary units) as a function of the angle of rotation of two adjacent magnetic triangles positioned at a centre–centre separation of 1.3 side length. (i–iv) Outlines of bright field microscope images of triangles dimerising under a field positioned on the energy map. The lowest energy corresponds to a tip-to-tip conformation consistent with the experimental results and triangles rotate to meet this conformation in the majority of cases (i and ii). Side-to-tip (iii) and side-to-side (iv) contacts form because the orientations associated with these contacts lie in the flatter regions of the energy landscape. The top panel shows a bright field image of a doublet and triplet of triangles that display the contacts outlined above. The triangles have 15 μm sides.

that any initial starting position can be chosen because it is defined by lithography, and more complex structures can thus be assembled from more elaborate starting patterns.

True thermodynamic self-assembly of colloids offers the most precise way to assemble colloidal structures but takes days to reach equilibrium. On the other hand, field-directed self-assembly displays enhanced kinetics but introduces defects in the formed structures.^{19,29} We present here a field-directed self-assembly method that avoids such defects by starting from predefined patterns of particles. This is a promising way to reach levels of precision similar to the thermodynamic routes while maintaining high throughput.

Besides fabrication applications and fundamental studies, these findings are also pertinent to techniques that use magnetic dipolar attraction of particles to probe mechanical properties of a macromolecular assembly.⁷ When gels of a polymer are adsorbed on the surface of such particles some of their mechanical properties can be extracted – a procedure that is useful for the study of physiologically relevant protein assemblies like cytoskeleton networks. While magnetic spheres tend to have the high magnetizations required to probe such materials, sphere–sphere contacts introduce some limitations that will vanish with flat surfaces. Thus, the use of the here-described particles with flat surfaces will enlarge considerably the number of key questions about the mechanics of cytoskeleton networks that can be addressed by this technique. As a first

step, we have confirmed that our synthesized particles allow protein grafting (see the ESI, S2[†]).

In conclusion, we have developed a simple method to fabricate superparamagnetic particles to sub-5 micron sizes with any 2D cross-section. The technique is lithography-based and because it allows almost close-packing of small superparamagnetic colloids, it permits magnetic susceptibilities of the highest order. By focusing on triangles we demonstrate the influence of geometry on the field-mediated organization of magnetic shapes. We find that triangles predominately dimerize tip-to-tip despite having, in isolation, no preferred orientation in the field, in agreement with finite element calculations. Our fabrication protocol allows us to pre-position the particles and we have demonstrated how regular square arrays can influence the chaining pathways and thus the conformation inside the chains. For instance, the character of the contacts among superparamagnetic squares is shown to be dependent on the angle of the applied field relative to the array. We also demonstrate how time-dependent field application gives control of the aggregation process with disks in an array aligned with the field producing a square-centered lattice of dimers before longer chains are formed. In short, we have introduced another form of anisotropy to guide assembly, that of relative particle position. This work therefore introduces a new route to make complex, pre-defined structures using anisotropy of both particle shape and position.

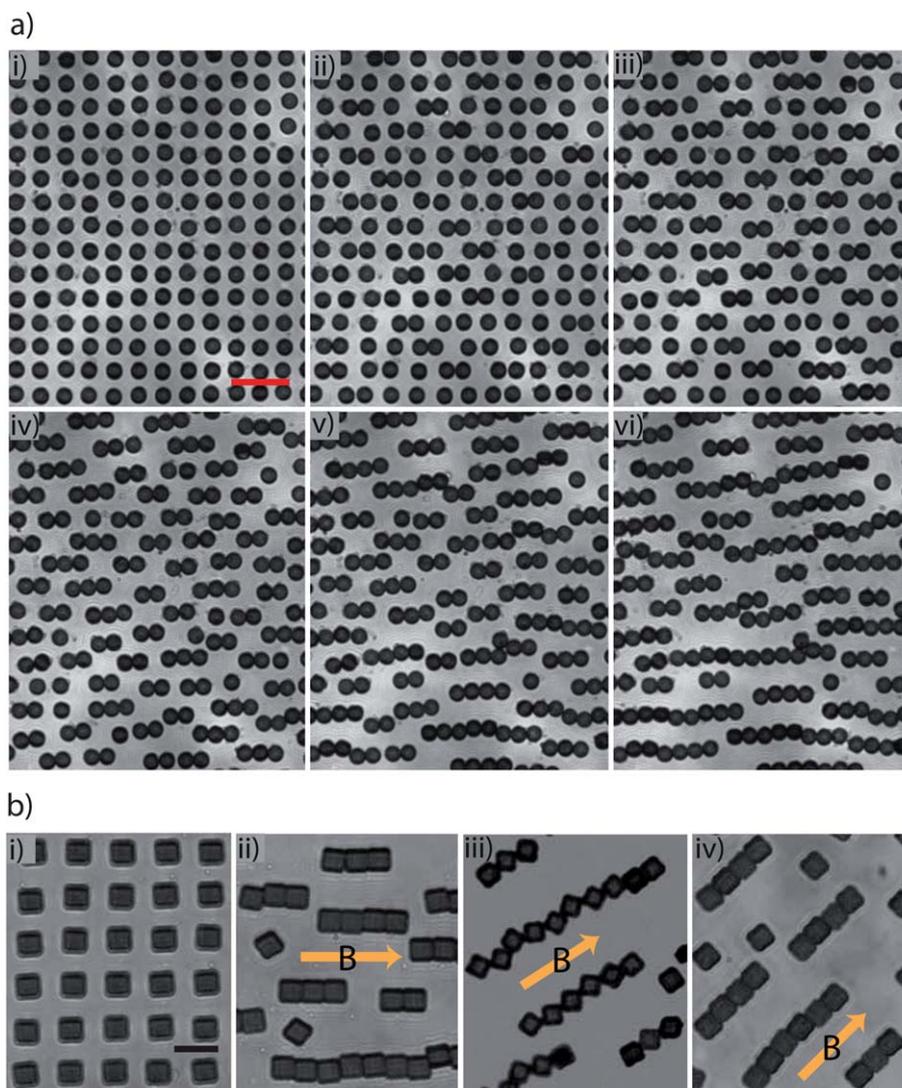


Fig. 6 Influencing aggregation with positional anisotropy. (a) (i–iv) Thin cylinders with a circular cross-section positioned on a square lattice form a face centered square lattice of dimers on application of a magnetic field. (v and vi) Chaining across multiple rows of the array proceeds after dimer formation. The cylinders have a depth of $3\ \mu\text{m}$ and the scale bar is $50\ \mu\text{m}$. (b) A demonstration of how the angle of the array with respect to a magnetic field influences the chaining of square prisms. (i) The starting array pattern before application of a magnetic field. (ii) When the field is aligned with the row of the array (field angle = 0°) side-to-side contacts are formed. (iii) When the array is 33° to the field direction disorganized chaining occurs. (iv) When the array is 45° to the field side-to-side chaining dominates again. The square prisms have a depth of $3\ \mu\text{m}$ and the scale bar is $20\ \mu\text{m}$.

Methods

Master template preparation

The designing of our arrays and shapes was performed on the software AUTOCAD and printing onto a chrome mask was implemented by Selba S.A. at 24 000 dpi. To fabricate the templates for the PDMS molds, hard-contact lithography onto a SU8 photoresist (Microchem), first spin-coated onto a silicon wafer, was performed on a SussMicrotec MJB4 Mask aligner using 365 nm light.

The depths of the photoresists were controlled following standard spin-coating routines, and exposure times were altered accordingly. The photoresists were developed in 1-methoxy-2-propanol acetate (Microchem). The above procedures were performed in a class 1000 clean room.

PDMS mold preparation

Solutions of PDMS monomer and cross-linker (Sylgard 184) were poured over photoresist masters and then degassed for 2 hours under a vacuum before reticulation at 70° for ~ 5 hours. After their removal from the photoresists, the PDMS molds were plasma treated and reacted with the chlorosilane *1H,1H,2H,2H*-perfluorooctyltrichlorosilane, *via* vapor deposition, for 2 hours to aid future loading and extraction of the material.

Fabrication of micro-shapes

Silica coated superparamagnetic colloidal particles (Silica-Ademabeads at 3 wt%) were spun down in a centrifuge and the supernatant (water) was removed and replaced by ethanol (Sigma, 99.9%). After redispersion, the mixture was cleaned further 10 times, in the same manner, to ensure the removal of

all the water. Finally, the ethanol supernatant was replaced with ETPTA (Sigma) containing 10 wt% of the photoinitiator 2-hydroxy-2-methyl-1-phenyl-propan-1-one (Sigma) to give a volume ratio of Adembeads : ETPTA of 1 : 1. Before loading, the silica dispersion was degassed along with the PDMS molds for ~1 hour and at this stage residual ethanol was also removed. The dispersion was then loaded into the degassed PDMS mold by gently spreading over the mold surfaces with a plastic pipette and the excess material was removed by pressing the mold gently onto a cleaned glass slide before degassing for a further hour. Reticulation took place overnight under a UVGK-58 hand held lamp (UVP) with 254 nm light.

To make our Janus particles, ethanol was first added to the silica dispersion to 50 v%. After loading into the PDMS molds, the ethanol was evaporated to leave the wells half-filled with the superparamagnetic mixture, which was then reticulated as standard. ETPTA containing a photoinitiator was then loaded above, where, on reticulation, it bonded to the superparamagnetic region below.

To extract our particles, firstly, poly(1-vinyl-pyrrolidone-co-vinylacetate) (P(VP-VA)), 70 wt% in iso-propanol (Sigma), was spread over the surface of a mold leaving, after the evaporation of isopropanol, a tacky residue. By pressing the polymer-covered mold onto a glass slide and gently retracting, the P(VP-VA) layer, with the particles embedded, are then transferred from the mold to the slide.

The Ademtech magnetic colloids have a nominal iron oxide content of 70% w/w, and a density of 2 g cm^{-3} . The ETPTA density is 1.1 g cm^{-3} . For shapes containing a proportion x of magnetic colloids in volume, the iron oxide content (w/w) is therefore $x \times 2 \times 0.7 / (x \times 2 + (1 - x) \times 1.1)$, which gives a value of 45% w/w for 50% volume of colloids.

Magnetic setup

After extraction, release of the particles from the P(VP-VA) was achieved with ethanediol. The high combined viscosity of the ethanediol and polymer allowed retention of the original array pattern for times long enough to permit sample loading on a Axio A1 inverted microscope (Carl Zeiss, Germany). The latter was mounted with two coaxial coils (SBEA, Vitry, Fr), with mu-metal cores (length: 40 mm, diameter: 26–88 mm, 750 spires), and this setup enables visualization of the particles' field response. The coils are powered by a bipolar operational power supply amplifier 6 A/36 V (Kepco, Flushing, NY) and controlled by Labview software (National Instruments, Austin, TX). Image data were acquired with a Neo sCMOS high speed camera (Andor Technology, Belfast, UK) and $\times 40$ (Zeiss, NA = 0.65), $\times 60$ (Zeiss, NA = 0.75) and $\times 100$ (Zeiss, NA = 1.4 (oil)) objectives as appropriate.

Measurements of magnetization

Superparamagnetic cylinders with 33% fraction of magnetic colloids are placed in an observation chamber. Cylinder diameter varied between 4.5 and 7 μm and lengths between 7 and 18 μm (two adjoining cylinders). To avoid any interaction of the cylinders with the bottom of the chamber, we flip the chamber

or lift the cylinder with a magnet just before the start of the experiment. A magnetic field gradient is created by using the magnetic setup described above with only one functioning coil. We record films of cylinders moving in the field gradient and sedimenting at the same time, and extract kymographs from the film. The speed of the cylinder is constant, until it comes close to the bottom of the chamber (see the ESI, S6†). The nominal magnetic force is $F_{\text{magnetic}} = MV\text{grad}(B)$, with M being the nominal magnetization at a given field, V the volume of the particle measured from the images, and $\text{grad}(B)$ the field gradient. The measured magnetic force is obtained from the equilibrium with the Stokes drag force: $F_{\text{drag}} = 6\pi\eta R_{\text{eq}} f_{\text{cylinder}} U$, with η being the viscosity of water, R_{eq} the radius of a sphere of the same volume as the cylinder, f_{cylinder} a correcting factor to take into account the shape of the cylinder,³⁰ and U the velocity of the cylinder measured on the kymograph. Discrepancy between the nominal and measured magnetization is deduced by a linear fit of the nominal to the measured magnetic force.

Acknowledgements

We would like to thank Jérôme Fresnais for insightful discussions, Raphaële Thevenin for advice on lithography and Camille du Roure for her help in editing. Funding for this work was provided by Agence Nationale de la Recherche ANR-09-PIRI-0001 Actimag and the Fondation Pierre-Gilles de Gennes.

References

- 1 U. Jeong, X. Teng, Y. Wang, H. Yang and Y. Xia, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 33–60.
- 2 I. Safarik and M. Safarikova, *Biomagn. Res. Technol.*, 2004, **2**, 7.
- 3 J. Muzard, M. Platt and G. U. Lee, *Small*, 2012, **8**, 2403–2411.
- 4 J. Ge and Y. Yin, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 5041.
- 5 S. Melle, M. Lask and G. G. Fuller, *Langmuir*, 2005, **21**, 2158–2162.
- 6 R. Dreyfus, J. Baudry, M. L. Roper, M. Fermigier, H. A. Stone and J. Bibette, *Nature*, 2005, **437**, 862–865.
- 7 T. Pujol, O. du Roure, M. Fermigier and J. Heuvingh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 10364–10369.
- 8 A. Snezhko and I. S. Aranson, *Nat. Mater.*, 2011, **10**, 698–703.
- 9 D. Zerrouki, J. Baudry, D. Pine, P. Chaikin and J. Bibette, *Nature*, 2008, **455**, 380–382.
- 10 J. Nunes, K. P. Herlihy, L. Mair, R. Superfine and J. M. DeSimone, *Nano Lett.*, 2010, **10**, 1113–1119.
- 11 S. Q. Choi, S. G. Jang, A. J. Pascall, M. D. Dimitriou, T. Kang, C. J. Hawker and T. M. Squires, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 2348–2352.
- 12 M. Suter, O. Ergeneman, J. Zürcher, C. Moitzi, S. Pané, T. Rudin, S. E. Pratsinis, B. J. Nelson and C. Hierold, *Sens. Actuators, B*, 2011, **156**, 433–443.
- 13 J. J. O'Mahony, M. Platt, D. Kilinc and G. Lee, *Langmuir*, 2013, **29**, 2546–2553.
- 14 O. D. Velev and S. Gupta, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 1897–1905.
- 15 S. C. Glotzer and M. J. Solomon, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 557–562.

- 16 S. C. Glotzer, *Nature*, 2012, **481**, 450–451.
- 17 M. Grzelczak, J. Vermant, E. M. Furst and L. M. Liz-Marzán, *ACS Nano*, 2010, **4**, 3591–3605.
- 18 K. J. Stebe, E. Lewandowski and M. Ghosh, *Science*, 2009, **325**, 159–160.
- 19 Y. Wang, Y. Wang, D. R. Breed, V. N. Manoharan, L. Feng, A. D. Hollingsworth, M. Weck and D. J. Pine, *Nature*, 2012, **491**, 51–55.
- 20 S. K. Suh, K. Yuet, D. K. Hwang, K. W. Bong, P. S. Doyle and T. A. Hatton, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 7337–7343.
- 21 J. P. Rolland, B. W. Maynor, L. E. Euliss, A. E. Exner, G. M. Denison and J. M. Desimone, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10096–10100.
- 22 K. van Ommering, Technische Universiteit Eindhoven, the Netherlands, 2010, <http://alexandria.tue.nl/extra2/658494.pdf>.
- 23 P. Jiang and M. J. McFarland, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 13778–13786.
- 24 J. Kim, S. E. Chung, S.-E. Choi, H. Lee, J. Kim and S. Kwon, *Nat. Mater.*, 2011, **10**, 747–752.
- 25 A. K. Johnson, A. M. Zawadzka, L. A. Deobald, R. L. Crawford and A. J. Paszczynski, *J. Nanopart. Res.*, 2007, **10**, 1009–1025.
- 26 G. Fonnum, C. Johansson, A. Molteberg, S. Morup and E. Aksnes, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, **293**, 41–47.
- 27 A. Babataheri, M. Roper, M. Fermigier and O. du Roure, *J. Fluid Mech.*, 2011, **678**, 5–13.
- 28 N. Coq, A. Bricard, F. Delapierre, L. Malaquin, O. du Roure, M. Fermigier and D. Bartolo, *Phys. Rev. Lett.*, 2011, 014501.
- 29 M. E. Leunissen, H. R. Vutukuri and A. van Blaaderen, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 3116–3120.
- 30 S. A. Allison, *Macromolecules*, 1999, **32**, 5304–5312.

**Sujet : Mesures mecaniques et génération de forces de réseaux
d'actine branchés avec des micro-cylindres magnétiques**

Résumé : Les travaux effectués dans cette thèse concernent la mécanique des gels d'actine branchés in vitro ainsi que leur processus de génération de forces contre des parois. Pour étudier ces effets, nous avons développé un nouveau montage expérimental, basé sur des mesures via l'auto assemblage de microcylindres superparamagnétiques sous un champ magnétique. Cela nous permet d'en déduire les relations entre force et vitesse des réseaux d'actine branchés, ainsi que de faire le lien entre force et mécanique, des sujets cruciaux en mécanique et en migration cellulaire.

Mots clés : actine, superparamagnétisme

**Subject : Mechanical measurements and force generation of branched
actin networks with micromagnetic cylinders**

Abstract : The work done during this tesis concerns the mechanics and force generation processes of branched actin networks reconstructed in vitro. To study these effects, we've developped a new experimental setup, based on self assembly of supermaramagnetic microcylinders under a magnetic force. This allows us to obtain relations between force and growth velocity of branched actin networks, as well as linking force generation with mechanics, which are crucial to understand cell mechanics and migration.

Keywords : actin, superparamagnetism