HAL
open science

Activité motrice de myosines dans des réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée in vitro

Mathieu Richard

To cite this version:

Mathieu Richard. Activité motrice de myosines dans des réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée in vitro. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB054 . tel-01734989

HAL Id: tel-01734989

https://theses.hal.science/tel-01734989v1

Submitted on 15 Mar 2018

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.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

École doctorale : Frontière du Vivant (ED 474)
Laboratoire : Institut Curie
Spécialité : Interface Physique – Biologie

Présentée par :

Mathieu RICHARD

Sujet de la thèse :

Activité motrice de myosines dans des réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée *in vitro*.

Soutenue le 07 octobre 2016

Membres du jury :

M. CAPPELLO Giovanni	Rapporteur
M. SALBREUX Guillaume	Rapporteur
M. BLANCHOIN Laurent	Examinateur
M. RIEF Matthias	Examinateur
M. ALLEMAND Jean-François	Président de jury
M. MARTIN Pascal	Directeur de thèse

Remerciements :

Ce travail de thèse arrive à son terme après plusieurs années de travail. Il ne fut possible que par l'intermédiaire de nombreuses personnes. Il m'est ainsi tout naturel de les remercier pour leur aide et leur temps passé à me soutenir.

J'aimerais tout d'abord remercier mon jury de thèse d'avoir bien voulu évaluer mon travail. Avoir été jugé par Giovanni CAPPELLO (Université Grenoble Alpes), Guillaume SALBREUX (University College London), Jean-François ALLEMAND (Université Paris Diderot), Laurent BLANCHOIN (Université Joseph Fourier) et Matthias RIEF (Technische Universität München) est pour moi une fierté supplémentaire car ils représentent à mes yeux la recherche d'excellence.

En second lieu, j'aimerais remercier les différents organismes qui ont financé et encadré mon travail. Je remercie ainsi 'Axa Research Found' pour avoir accepté de financer ma thèse pendant trois ans, ainsi que la Fondation de la Recherche Médicale pour avoir financé son prolongement d'un an. Je remercie également mon école doctorale 'Frontière du Vivant', mon université de rattachement, l'université Paris Descartes, ainsi que l'institut Curie et l'UMR 168 pour leur encadrement. Au-delà du financement propre de ma thèse, mon travail n'aurait pas été possible sans les financements octroyés à mon équipe provenant de différents organismes tels que l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), 'PSL Research University', le CNRS, l'université Pierre et Marie Curie et le LabEx CelTisPhyBio. Ces financements ont été obtenus grâce au niveau d'excellence de la recherche scientifique produite par l'équipe de Pascal MARTIN depuis plus d'une décennie. Scientifiquement, ce fut un plaisir de travailler dans un tel milieu et je remercie Pascal pour son implication et sa rigueur scientifique dont il a su faire preuve tout au long de notre collaboration qui remonte déjà à cinq ans et demi. Ce projet a notamment été possible grâce au financement ANR commun avec deux autres équipes. Je tiens à remercier les chefs de ces équipes, Cécile SYKES (UMR 168) et Laurent BLANCHOIN (iRTSV), pour leur participation. J'aimerais aussi remercier Cécile SYKES pour son soutien tout au long de mon travail. De manière plus générale, j'ai bénéficié de collaborations que je qualifierai d'exceptionnelles. Sans ces atouts, il m'aurait été impossible de mener à bien mon travail de recherche. C'est ainsi que je remercie tout particulièrement Hajer ENNOMANI et plus généralement l'équipe de Laurent BLANCHOIN (iRTSV) située au CEA de Grenoble pour toutes les discussions scientifiques que l'on a pu avoir, ainsi que pour l'énergie et le temps qu'ils ont investis à me former sur la polymérisation de réseaux de filaments d'actine à partir de micro-motifs de protéines. Je souhaite également remercier fortement Carles BLANCH-MERCADES (UMR 168) pour tout le travail de modélisation qu'il a fourni et qui a apporté une dimension supplémentaire à ce manuscrit. Pour ce travail de théorie, je remercie également Jean-François JOANNY (UMR 168, ESPCI) ainsi que Frank JÜLICHER (MPIPKS, Dresden). Je remercie Enrique DE LA CRUZ (Yale) et Matthias RIEF (Tech-

nische Universität München) pour les moteurs moléculaires qu'ils nous ont donnés. Enrique De La Cruz a porté un grand intérêt à ma recherche, j'ai apprécié les discussions scientifiques que l'on a eues ensemble et je le remercie de l'éclairage qu'il a pu amener à mon projet. Je tiens aussi à remercier Ayako Amada (UMR 168) et Evelyne Coudrier (UMR 144) pour leurs conseils et la formation qu'ils m'ont donné sur la culture cellulaire pour la production de moteurs moléculaires.

Cette thèse a nécessité un travail qui n'est pas perceptible par ce seul manuscrit. En effet, il a fallu réorienter mon projet de thèse au bout de trois ans. Cette réorientation a été en partie possible grâce aux conseils avisés de mon comité de thèse qui a apporté un point de vue externe régulier sur l'avancement de ma recherche. Je remercie ainsi Jean-François Allemand (UMR 8550), Timo Betz (ZBME, Münster), Didier Chatenay (Laboratoire Jean Perrin) et Sylvie Retailleau (Doyen de l'université d'Orsay) pour leur participation.

L'institut Curie a su développé différentes plateformes spécialisées. J'ai ainsi pu bénéficier de l'expertise de personnes très qualifiées. Je tiens ainsi à remercier la plateforme de mécanique composée de Eric Nicoleau et Rémy Fert, pour m'avoir dessiné et usiné des pièces indispensables pour la réalisation de mes expériences. La plateforme de biologie moléculaire et de biochimie dirigée par Julie Plastino et composée de John Manzi et de Fahima Faqir m'a énormément apporté notamment en réalisant de nombreux protocoles biochimiques et en me transmettant le savoir nécessaire pour leurs réalisations ; je les en remercie. L'institut Curie est doté d'une plateforme d'imagerie : le 'Nikon Image Center'. Je remercie les membres de cette plateforme, notamment Lucie Sengmanivong, Vincent Fraisier et Ludovic Leconte, pour leurs formations et leurs conseils sur l'imagerie sur microscope confocal à disque rotatif. Le professionnalisme et la bonne humeur des différents services de l'UMR 168 (Informatique, administratif, accueil, ...) donne un cadre plaisant pour travailler ; je veux ainsi remercier ces personnes qui ont égaillé mon quotidien, notamment Brigitte Da Silva et Laurence Turpin.

Durant cette thèse j'ai eu l'opportunité et la joie de côtoyer des personnes aux qualités humaines indéniables. Je remercie Volker Borthuth (Laboratoire Jean Perrin) et Jonathan Lee-Tin-Wah pour leur jovialité et leur positivisme qui m'ont permis plus d'une fois de me remotiver dans les moments difficiles. Je tiens également à remercier Mélanie Tobin avec qui nous nous sommes mutuellement soutenus durant nos thèses au sein de l'équipe de Pascal Martin. Je suis également ravi que Marie Pochitaloff-Huvale prenne la suite de mon travail et je lui souhaite de réussir dans cette recherche.

Bien évidemment, de manière plus générale, je suis reconnaissant de ce que m'a apporté l'institut Curie et j'aimerais remercier toutes les personnes qui, dans les moments les plus durs, ont été là en m'évitant d'interrompre mon travail de thèse. Ainsi je tiens spéciale-

ment à remercier mes 'co-bureaux' Stéphanie MANGENOT, Lucie PERQUIS et Fabrice VALENTINO. Au-delà du bureau, je remercie Fahima FAQIR pour ces instants de détentes autour d'un thé ainsi que Majdouline ABOU-GHALI.

Mon travail de thèse a nécessité une implication personnelle de tous les instants. Je remercie mes amis qui m'ont soutenu durant cette traversée, notamment Cyril, Alice, Florian et Laure. Je remercie également ma famille pour tous les efforts de compréhension dont ils ont su faire preuve. Je les remercie pour leur présence et leur écoute et pour m'avoir poussé à m'aérer, à me reposer lorsque j'en avais le plus besoin. Cette présence a été ma source principale d'énergie. Je remercie ainsi mes parents, mes deux frères Cédric et Jérôme, mes belles sœurs Alice et Laurine, mes cousins Nicolas, Alexandra, Nathalie, Yann, Julie, Ugo, Jean-Michel, Valérie, mes oncles et tantes Yves, Angela, Louis, Anne-Marie, Antoinette, mes beaux-parents et beaucoup d'autres comme David, Marjorie, Maxime, Camille, … Je tiens également à remercier mes nièces et neveux Zoé, Lily-Rose et Romain qui sont nés durant ma thèse, ainsi que ceux qui ne seraient tarder, car leur arrivée a été déterminante dans mon choix de carrière en me faisant prendre conscience de l'équilibre que je souhaitais entre mes ambitions professionnelles et ma vie personnelle.

Il ne me reste plus qu'une personne à remercier, la plus importante, celle qui a fait le plus d'efforts et de concessions, celle que j'appelle souvent ma moitié, ma compagne, ma pacsée mais que j'aurai le plaisir d'appeler ma femme : Laurène. Je lui dédicace cette thèse.

Résumé :

Les moteurs moléculaires permettent le transport actif de molécules et d'organelles le long de filaments polaires du cytosquelette de la cellule eucaryote. Les filaments peuvent s'organiser en réseaux parallèles, antiparallèles, ou désordonnés. Malgré son importance, l'influence de l'architecture du cytosquelette sur le transport de cargos par des moteurs moléculaires est souvent ignorée. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé des patrons surfaciques de nucléation pour contrôler la géométrie de polymérisation de filaments d'actine. Cette approche permet de reproduire *in vitro* les trois types de réseaux qui sont observés *in vivo*. En adsorbant des moteurs moléculaires purifiés à la surface de nanobilles fluorescentes (diamètre 200 nm), nous avons étudié le transport de ces cargos dans des réseaux antiparallèles émergeant de deux lignes de nucléation parallèles. Nous avons observé que les billes recouvertes de moteurs processifs HMM-V (Heavy Mero-Myosine V) génèrent des mouvements dirigés en direction du milieu du réseau où la polarité moyenne des filaments est nulle et où les billes s'accumulent. De plus, la distribution de positions des billes à l'état stationnaire peut être déduite des profils de vitesse et de diffusion des billes, indiquant que le transport actif suit un processus de convection-diffusion. Les billes recouvertes de moteurs non-processifs HMM-II (Heavy Mero-Myosine II) démontrent des comportements similaires. Cependant, bien que le gradient de vitesse des billes HMM-II soit plus important que pour les billes HMM-V au centre du réseau, le coefficient de diffusion l'est bien davantage. Le centrage de ces billes est ainsi moins précis qu'avec la HMM-V. A notre surprise, nous avons observé que la précision du centrage ne dépend pas de l'espacement entre les deux lignes de nucléation, donc de la taille du système. Le comportement des billes est décrit par un modèle à trois états dans lequel la bille sonde localement la polarité nette du réseau en se détachant et en se rattachant fréquemment aux filaments. Une séquence stochastique de déplacements dirigés dans un état attaché aux filaments et d'explorations diffusives dans un état détaché, conduit à une marche aléatoire biaisée avec un coefficient de diffusion et une vitesse effectifs. Notre description physique indique que la précision du positionnement des billes dépend du gradient de polarité nette du réseau de filaments ainsi que de la distance moyenne de parcours des billes dans l'état attaché à l'actine. Nos résultats démontrent ainsi le rôle clef que joue l'architecture du réseau de filaments sur les propriétés du transport.

Dans la cellule, les moteurs moléculaires permettent également la réorganisation des filaments du cytosquelette. En ajoutant nos moteurs moléculaires en solution, nous avons observé qu'un réseau de filaments d'actine parallèles, polymérisés *in vitro* à partir d'une ligne ou d'un disque de nucléation, peut former spontanément des faisceaux oscillants. Ces oscillations ressemblent aux battements du flagelle du spermatozoïde. En particulier, le système génère des ondes de déformation transverses se propageant de la base à l'apex du faisceau oscillant à une vitesse de 0,5 µm/s. Au cours du temps, les faisceaux d'actine s'épaississent, ce qui conduit à un ralentissement de l'oscillation avec une période qui croît de 25 s à 40 s. De plus, nous avons observé que des faisceaux d'actine voisins sont capables de se synchroniser, comme c'est le cas entre les deux flagelles de l'algue Chlamydomonas. Notre système acto-myosine minimal permet donc d'imiter le battement de flagelles, bien que la nature des moteurs moléculaires et des filaments en jeu soit complètement différente. Ainsi, ce système fournit un nouvel outil pour étudier les propriétés physiques génériques du battement flagellaire.

Abstract:

Molecular motors navigate the cytoskeleton to position vesicles and organelles at specific locations in the cell. Cytoskeletal filaments assemble into parallel, antiparallel or disordered networks, providing a complex environment that constrains active transport properties. Using surface micro-patterns of nucleation-promoting factors to control the geometry of actin polymerization, we studied *in vitro* the interplay between the actin-network architecture and cargo transport by small myosin assemblies. With two parallel nucleation lines, we produced an antiparallel network of overlapping filaments. We found that 200nm beads coated with processive myosin V motors displayed directed movements towards the midline of the pattern, where the net polarity of the actin network was null, and accumulated there. The bead distribution was dictated by the spatial profiles of bead velocity and diffusion coefficient, indicating that a diffusion-drift process was at work. Interestingly, beads coated with skeletal heavy mero-myosin II motors showed a similar behavior. However, although velocity gradients were sharper with myosin II, the much larger bead diffusion observed with this non-processive motor resulted in less precise positioning. Strikingly, bead positioning did not depend on the spacing between the nucleation lines. Our observations are well described by a three-state model of bead transport, in which active beads locally sense the net polarity of the filament network by frequently detaching from and reattaching to the filaments. A stochastic sequence of processive runs and diffusive searches results in a biased random walk with an effective drift velocity and diffusion coefficient. Positioning relies on spatial gradients of the net actin polarity, as well as on the run length of the cargo in the attached state. Altogether, our results on a minimal acto-myosin system demonstrate the key role played by the actin-network architecture on motor transport.

Molecular motors can also deform and reorganize the cytoskeleton. Adding heavy mero-myosin II or V in bulk, we observed that parallel networks of actin filaments emerging from a nucleation line or disk can self-assemble into bundles that beat periodically like the flagellum of the spermatozoid. In a preliminary analysis, we observed waves of deformation travelling from the base to the tip of the bundle at a speed of 0,5 µm/s. As time went by, the bundles grew thicker, resulting in an increase of the beating period (range: 25-40 s). In addition, neighboring actin 'flagella' were able to synchronize, as observed *in vivo* for instance with the the two flagella of the algae Chlamydomonas. Our minimal acto-myosin system thus mimicked key properties of microtubule-based flagellar beating, despite the different nature of the motors and cytoskeletal filaments involved. This system thus provides a new tool to study the generic physical properties of flagellar beating.

Tables des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE **5**

LE SYSTÈME ACTO-MYOSINE **9**

A LE RÉSEAU D'ACTINE 9

1. Des monomères au filament 10
   a. Structure de l'actine 10
   b. Cinétique de polymérisation, état stationnaire, concentration 'critique' en monomère 11
   c. Cycle d'ATPase du filament d'actine 15
2. Structure et dynamique de l'actine *in vivo*, protéines régulatrices 16
   a. La profiline : régulation de l'assemblage de l'actine 17
   b. Le complexe Arp 2/3 : nucléation de filaments 19
   c. La phalloïdine : stabilisation de filaments 20
3. La diversité des architectures d'actine dans le cytosquelette cellulaire 21
   a. Le réseau parallèle 22
   b. Le réseau antiparallèle 23
   c. Le réseau désordonné ('actin meshwork') 23
4. Les réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée *in vitro* 23

B LA MYOSINE 27

1. Fonctions de la myosine 28
2. Structure de la myosine et états conformationnels 29
3. Cycle d'hydrolyse de l'ATP et rapport de charge 33
4. Couplage mécano-biochimique 34
5. Pas, vitesse et 'run length' 35
   a. Pas et vitesse 35
   b. Vitesse *in vitro* 37
   c. Distance de parcours ('run length') 39
6. Mécano-sensibilité 40
   a. Effet d'une force extérieure sur le taux d'ATPase 40
   b. Relation force-vitesse 42
   c. Effet d'une force extérieure sur la distance de parcours et la durée de la trajectoire d'un moteur 43
7. Propriétés émergentes d'un groupe de myosines évoluant dans un réseau de filaments d'actine : effets collectifs 44
   a. Oscillations spontanées par une assemblée de moteurs 44
   b. Influence de l'architecture du cytosquelette sur les propriétés du transport intracellulaire 47
8. Tableau récapitulatif des propriétés individuelles des myosines II, V et VI 49

TECHNIQUES ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES **51**

A FABRICATION DE RÉSEAUX DE FILAMENTS D'ACTINE D'ARCHITECTURE CONTROLÉE *IN VITRO* 51

1. Motifs de nucléation 51
2. L'anti-photo-blanchiment 54
3. Composition de la solution de polymérisation 55
B Billes couvertes de moteurs moléculaires 57
1. Protocole de fonctionnalisation des billes 57
2. Estimation du nombre de moteurs par bille. 59
C Activité *in vitro* des protéines 61
1. Test de motilité 61
a. protocole 61
b. Résultat : vitesse de nos myosines 63
2. Le 'test pyrène' : dynamique de polymérisation de l'actine 63
a. Protocole 63
b. Caractérisation de nos protéines 64
D Microscopie, acquisition des données et traitement de l'image 66
1. Microscopie 66
2. Acquisition des données 66
3. Traitement d'image et analyse des réseaux d'actine 67
a. Transformation spatiale et relevé des coordonnées du réseau 67
b. Mesure du profil de densité d'un réseau d'actine 68
4. Détection et analyse de trajectoire de billes 69
a. Filtrage des trajectoires 70
b. Estimation de la distribution stationnaire des billes dans un réseau antiparallèle 71
c. Analyse globale des trajectoires : mouvement quadratique moyen 72
d. Analyse locale des trajectoires : profil de vitesse et de diffusion 74
e. Distribution stationnaire de position pour un processus de convection-diffusion 76

TRANSPORT ET POSITIONNEMENT DE BILLES CARGOS DANS UN RÉSEAU ANTIPARALLÈLE D'ACTINE 79

A Le réseau de filaments d'actine *in vitro* 79
1. Structure et dynamique des réseaux 80
a. Structure des réseaux 80
b. Dynamique de polymérisation 84
2. Modélisation de la polymérisation 86
a. Dynamique de nucléation-élongation 86
b. Nucléation-élongation en présence d'un processus rare de coiffe des bouts barbés 89
c. Discussion 93
B Mouvements de billes passives 94
1. Description qualitative des trajectoires 94
2. Analyse globale des trajectoires 96
3. Distribution des billes 99
4. Analyse locale des mouvements : vitesse et diffusion en fonction de la position100
C Transport de billes actives 103

1. Les myosines II et V 103
a. Transport dans les réseaux parallèles 103
b. Transport dans un réseau antiparallèle : effet de centrage 105
2. La myosine VI 115
a. Description qualitative des trajectoires 115
b. Analyse globale et locale des mouvements 116
D MODÈLE A TROIS ÉTATS 119
1. Le modèle 119
2. Longueurs et temps caractéristiques, classification des comportements 121
3. Approximation du transport à un processus de convection-diffusion, expressions analytiques de la vitesse et du coefficient de diffusion effectifs des billes 124
4. Valeur des paramètres 128
a. Taux d'attachement et de détachement pour les myosines II et V 128
b. De la bille aux moteurs : nombre de moteurs impliqués 129
5. Discussion 130
a. Surface d'interaction des billes de myosines II avec le réseau 130
b. Limites du modèle 131
c. Trajectoires individuelles 132
d. Positionnement des billes dans un réseau asymétrique 133

RÉORGANISATION D'UN RÉSEAU DE FILAMENTS D'ACTINE SOUS L'ACTION DE MYOSINES EN SOLUTION : OSCILLATIONS DE FLAGELLES D'ACTINE 135

A LES RÉSEAUX D'ACTINE 135
B CONTRACTION D'UN RÉSEAU ACTIVÉE PAR LA MYOSINE VI 137
C AUTO-ORGANISATION ET OSCILLATIONS SPONTANÉES DE FLAGELLES D'ACTINE 138
1. Conditions d'existence et variation de la géométrie des flagelles 138
a. Faisceaux précurseurs 138
b. Réorganisation des réseaux sous l'effet de la lumière et de l'activité de myosines 140
2. Le comportement individuel d'un 'flagelle' d'actine 141
3. Le comportement collectif de 'flagelles' d'actine 144
a. Faisceaux parallèles 144
b. Fusion de faisceaux 145

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 147

ANNEXES 151

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 181

Introduction générale

La production de travail mécanique est essentielle à la survie des organismes vivants. A l'échelle moléculaire, une catégorie de protéines –appelées 'moteurs moléculaires'– est très souvent à l'origine de cette activité. En interagissant avec des polymères tels que les microtubules ou les filaments d'actine, deux des éléments constitutifs du cytosquelette de la cellule eucaryote, les moteurs moléculaires transforment l'énergie biochimique issue de l'hydrolyse d'un nucléotide (l'ATP) en travail mécanique.

Les moteurs moléculaires ont des fonctions diverses. Ils transportent des molécules et des organelles le long des filaments du cytosquelette entre différents compartiments fonctionnels de la cellule. Des processus physiologiques fondamentaux, comme la morphogénèse, dépendent du bon adressage par les moteurs moléculaires de leurs cargos à des endroits spécifiques dans la cellule. D'autre part, les moteurs moléculaires peuvent également déformer le cytosquelette en faisant glisser les filaments les uns par rapport aux autres, en les réorientant ou en les tordant. Cette forme de motilité est à la source de la contraction musculaire ainsi que de nombreux mouvements cellulaires, comme durant la division d'une cellule en deux cellules filles, la migration cellulaire observée durant les processus de cicatrisation des tissus, ou encore les oscillations de la touffe ciliaire mécano-sensorielle des cellules ciliées de l'oreille interne. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons aux myosines, des moteurs qui se déplacent le long des filaments d'actine. Chaque filament d'actine étant polarisé, il se comporte comme une voie de circulation à sens unique, avec un sens de mouvement qui dépend du type de myosine utilisé. La myosine VI se déplace vers le bout 'pointu' du filament alors que les myosines II et V produisent des mouvements de polarité opposée (bout 'barbé').

Au cours des vingt-cinq dernières années, les moteurs moléculaires ont fait l'objet de nombreuses études, en particulier dans le domaine de la biophysique. En permettant la manipulation de molécules uniques, le développement d'outils comme les pinces optiques a permis d'identifier les différentes étapes du cycle mécano-chimique d'un moteur et ainsi d'appréhender le mécanisme fondamental de production de force. Notre compréhension, à l'échelle de la molécule unique, du fonctionnement d'un nombre relativement important de moteurs moléculaires tels que la myosine, la dynéine ou la kinésine, a ainsi progressé de manière spectaculaire. Néanmoins, *in vivo*, les moteurs moléculaires opèrent très souvent en groupe, ce qui peut conduire à des effets collectifs émergents qu'il n'est pas possible de déduire simplement des propriétés de la molécule individuelle. Il y a par exemple les oscillations spontanées du flagelle du spermatozoïde, l'apparition de mouvements bi-directionnels ou d'embouteillages dans le transport intracellulaire, ou encore la formation de structures dynamiques dans le cytosquelette cellulaire. Malgré son importance, la synergie ou la compétition qui peut résulter de l'activité collective d'un groupe de moteurs moléculaires est encore mal comprise.

De plus, l'architecture du cytosquelette dans lequel évoluent les moteurs moléculaires est à la fois inhomogène et complexe. Dans le cas du cytosquelette d'actine,

les filaments peuvent s'organiser en faisceaux de filaments parallèles, comme dans les microvillosités intestinales, les filopodes et les stéréocils de la touffe ciliaire auditive, ou en faisceau de filaments antiparallèles, comme dans le cas des fibres musculaires et des fibres de stress, ou enfin en un réseau branché désorganisé, comme dans le lamellipode ou le cortex cellulaire. Ces différences d'organisation imposent des contraintes au transport par les myosines, certaines classes pouvant même être exclues de zones d'architecture donnée. Pourtant, l'influence de l'architecture du cytosquelette sur le comportement des moteurs (et vice versa) est peu caractérisée et même souvent ignorée.

L'objectif général de cette thèse est d'éclairer les règles du transport intracellulaire et de l'auto-organisation du cytosquelette par des moteurs moléculaires. Notre approche consiste à développer un système biomimétique *in vitro* du cytosquelette d'actine contenant un nombre minimal de protéines purifiées. Nous avons bénéficié d'une technique innovante introduite par l'équipe de L. Blanchoin et M. Thery (CytoMorphoLab, CEA, Grenoble) pour générer un réseau de filaments d'actine d'architecture contrôlée. En particulier, nous avons fabriqué des réseaux antiparallèles. En mettant des billes couvertes de myosines en interaction avec ce type de réseau, nous avons étudié comment le mouvement dirigé d'un cargo le long de filaments orientés dans une direction est contrarié par la présence de filaments orientés dans la direction opposée. Cette situation nous a permis de préciser les conditions qui conduisent à l'arrêt des billes, et donc à leur positionnement dans le réseau.

Afin de déterminer comment les propriétés individuelles des moteurs influencent le transport des billes, nous avons travaillé avec trois différents types de myosines : la myosine V, la myosine VI et la myosine II. Les myosines V et VI sont deux moteurs processifs impliqués dans le transport intracellulaire mais qui se déplacement dans des directions opposées le long des filaments d'actine. La myosine II est un moteur non-processif qui sous-tend habituellement, en groupes de plusieurs centaines de molécules, la contraction musculaire. Ici, la myosine II a été détournée de sa fonction première pour servir de moteur de transport ; le mouvement est dans le même sens que celui de la myosine V. Les cargos utilisés sont des billes de 200nm de diamètre, une taille comparable à celle des vésicules qui sont transportées *in vivo*. Cette petite taille ne permet pas à un grand nombre de moteurs d'interagir avec l'actine à chaque instant. Par conséquent, nous nous mettons dans des conditions où les fluctuations dans l'activité du petit groupe de moteurs qui se trouve sur le cargo peuvent être importantes, comme c'est très certainement le cas dans la cellule.

Par ailleurs, nous avons étudié l'effet de l'activité de la myosine II (ou V) sur l'architecture d'un réseau de filaments parallèles lorsque les moteurs sont rajoutés dans le bain. Nous avons observé que les filaments s'auto-organisent en faisceaux et que ces faisceaux se mettent à onduler périodiquement, comme le flagelle d'un spermatozoïde ou de l'algue unicellulaire Chlamydomonas. Cette observation complètement inattendue et spectaculaire a ouvert récemment un nouveau champ d'étude. Notre travail sur le sujet demeure préliminaire et se bornera à une description qualitative du phénomène.

Le manuscrit est organisé en quatre chapitres. Le Chapitre I présente un état de l'art, non exhaustif, du couple acto-myosine. Nous y décrivons la dynamique de

nucléation et de polymérisation des filaments d'actine, les mécanismes de régulation du processus de polymérisation par des protéines associées à l'actine, ainsi que les structures des réseaux d'actine présents dans la cellule et leurs rôles. Nous nous intéressons ensuite aux propriétés élémentaires des myosines utilisées dans ce travail de thèse, notamment leurs cycles mécano-chimiques, ainsi qu'aux comportements collectifs qui peuvent émerger lorsque les myosines opèrent en groupe. Le Chapitre II décrit les différentes techniques et méthodes expérimentales que nous avons utilisées, en particulier pour fabriquer un réseau de filaments d'actine d'architecture contrôlée ainsi que pour enregistrer et analyser les trajectoires de plusieurs centaines de billes actives (lorsqu'elles sont couvertes de myosines) ou passives qui s'y déplacent. Les Chapitre III et IV sont consacrés aux résultats. Dans le Chapitre III, nous caractérisons tout d'abord les profils de densité des réseaux parallèles et antiparallèles d'actine que nous avons fabriqués, ainsi que leur dynamique de croissance. Nous observons des profils exponentiels que nous n'arrivons pas à comprendre à partir d'un simple processus d'élongation-croissance. Une analyse théorique, développée en collaboration avec F. Jülicher (MPIPKS, Dresde), permet de discuter l'origine de ces profils. Nous décrivons ensuite nos observations du transport de billes-myosines ou de billes passives dans ces réseaux. Enfin, nous interprétons nos résultats sous l'éclairage d'une description physique du transport qui a été développée en collaboration avec F. Jülicher (MPIPKS, Dresde), JF Joanny (ESPCI/Curie, Paris) et son étudiant en post-doctorat C. Blanch-Mercades. Le chapitre IV décrit la formation et les battements de 'flagelles' acto-myosine sous l'effet de l'activité en volume de myosines placées dans le bain avec un réseau parallèle de filaments d'actine.

Chapitre 1

Le système acto-myosine

La cellule eucaryote est un système complexe et dynamique. Elle a la capacité de se diviser, de se déformer et de se déplacer dans des environnements de géométries variées pour accomplir des processus biologiques vitaux (morphogénèse embryonnaire, surveillance immunitaire, angiogenèse, réparation cellulaire, régénération, battement de la queue du spermatozoïde, etc.). Sous-jacente à ces fonctions mais également à bien d'autres, la cellule présente une activité interne permettant de recruter différents éléments biologiques par transport intracellulaire de part et d'autre de son volume. L'essentiel de cette activité dépend du cytosquelette, un réseau complexe de filaments semi-rigides définissant l'architecture de la cellule. Le cytosquelette est généré à partir de trois types de polymères : l'actine, le microtubule et le filament intermédiaire. Il peut développer des forces de deux façons. D'une part, il a la capacité de reconfigurer rapidement son architecture en polymérisant ou en dépolymérisant. D'autre part, il interagit avec des protéines spécifiques appelées 'moteurs moléculaires' qui, en utilisant des ressources d'énergie d'origine biochimique, permettent de faire glisser les filaments les uns par rapport aux autres, conduisant à la contraction du réseau. Les moteurs moléculaires permettent également le transport dirigé de particules 'cargo' le long des filaments du cytosquelette.

Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à une famille particulière de moteurs : la myosine. Comme cette protéine produit son activité mécanique en interagissant avec les filaments d'actine, nous désignerons ce couple comme le système 'acto-myosine'. Cette activité résulte de la transduction de l'énergie d'hydrolyse de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) en travail mécanique.

Dans ce chapitre, nous allons décrire l'état des connaissances du processus dynamique de polymérisation de l'actine ainsi que les conséquences au niveau cellulaire d'un tel processus. Nous allons présenter ensuite la famille des myosines, leurs fonctions et structures, avant d'exposer leurs interactions biochimique et mécanique avec l'actine et les modèles qui permettent de décrire ces interactions. Enfin nous finirons par quelques exemples de comportements collectifs des myosines dans la cellule.

A Le réseau d'actine

Une cellule musculaire, déshydratée à l'acétone puis replongée dans une solution à bas sel, développe un gel après augmentation du niveau de salinité. En 1942, cette observation permit à Straub de découvrir l'actine (Ent et al. 2001). Cette molécule est l'une des protéines les plus abondantes des cellules eucaryotes. Elle y représente 5 à 10% des protéines. Ce pourcentage atteint même 20% dans les cellules musculaires. L'actine est commune à un grand nombre d'espèces et ne présente qu'une

faible variation de sa séquence polypeptidique ; dans les cellules musculaires squelettiques des vertébrés à sang chaud cette protéine est même identique. Peu courante, cette conservation au cours de l'évolution peut s'expliquer par l'importance des fonctions de l'actine résultant de son interaction avec de multiples protéines : une seule modification bénéfique pour un processus se ferait statistiquement aux détriments des autres.

1. Des monomères au filament

   a. Structure de l'actine

L'actine se présente sous deux formes distinctes : l'actine monomérique globulaire, appelée 'actine G', et l'actine filamenteuse, nommée 'actine F', qui résulte de l'association de plusieurs monomères. La forme globulaire est une molécule de 43 kDa composée de quatre sous-domaines regroupant 375 acides aminés. Cette structure n'a pu être obtenue qu'à partir de cristaux complexés avec d'autres molécules pour éviter la polymérisation. Néanmoins, la même structure est observée à travers différentes molécules de complexation (Kabsch et al. 1990, McLaughlin et al. 1993, Schutt et al. 1993). L'actine présente également une polarité. Les sous-domaines 1 et 3 définissent le bout (ou extrémité) dit 'barbé', tandis que les sous-domaines 2 et 4 constituent le bout dit 'pointu'. Généralement, le monomère d'actine est associé dans la cellule à un cation divalent Mg^{2+} et peut se lier à des nucléotides tels que la molécule d'Adénosine Triphosphate (ATP) ou d'Adénosine Diphosphate (ADP) (Figure 1). Dans des conditions physiologiques, l'affinité de la molécule d'ATP avec l'actine étant plus forte que celle de l'ADP et son hydrolyse étant lente, l'actine est généralement associée avec une molécule d'ATP (Figure 1). L'interaction de l'actine avec son environnement dépend de la nature du nucléotide associé (Blanchoin et al. 1999, Zimmermann et al. 2015).

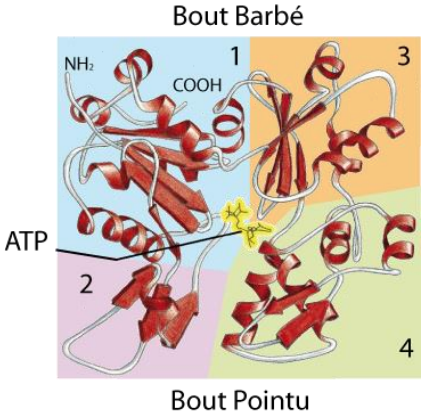


Figure 1 : Structure du monomère d'actine. Le monomère d'actine se compose de 4 sous domaines. Les sous-domaines 1 et 3 définissent le bout barbé tandis que les sous-domaines 2 et 4 constituent le bout pointu. Au centre se trouve une cavité pouvant accueillir un nucléotide, ici de l'ATP et le cation divalent (Mg2+ ou Ca2+). (adapté de Ent et al. 2001, Alberts et al. 2008, Preller et al. 2013)

L'actine a la capacité de passer de l'état globulaire à l'état filamenteux par un processus de polymérisation. Dans le sens contraire, il s'agit du phénomène de dépolymérisation. Le filament d'actine est un polymère semi-flexible de longueur de persistance de 15 µm ; cette longueur est relativement faible comparée à celle du microtubule qui atteint une valeur de 5 mm, ce qui traduit la rigidité beaucoup plus impor-

tante de ce dernier (Gittes et al. 1993). Elle est cependant comparable à la taille cellulaire, ce qui lui confère une rigidité appréciable à cette échelle. Le filament forme une double hélice de demi-période 36 nm ; l'ajout d'un monomère allonge la structure suivant son axe principal de 2,77 nm (Howard 2001). Son épaisseur n'étant que de 7 nm, le filament est souvent marqué d'un fluorophore pour le visualiser en microscopie photonique. Les monomères alignant leurs polarités durant la polymérisation, le filament d'actine présente également un bout barbé et un bout pointu, définissant sa propre polarité (Figure 2). L'origine de la terminologie différenciant ces bouts provient de l'observation du filament d'actine décoré de myosines conventionnelles (voir page 27). Ces moteurs ont une configuration géométrique d'accrochage telle qu'ils dessinent grossièrement sur le filament des chevrons enchâssés les uns dans les autres, faisant apparaître une extrémité pointue d'un côté du filament et barbée de l'autre (Figure 4, Milligan et al. 1990).

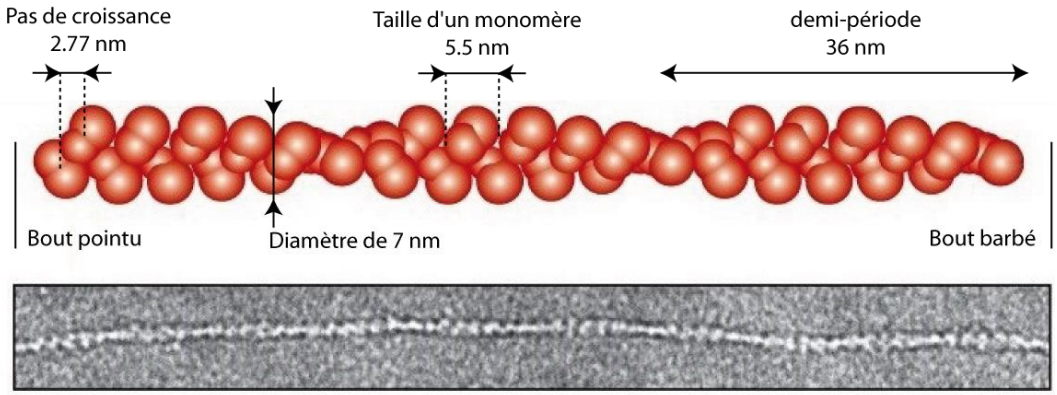


Figure 2 : Structure du filament d'actine. Le filament d'actine est une double hélice de demi-période 36 nm et de 7 nm d'épaisseur. Cette demi-période se compose de 13 monomères d'actine. En bas, un cliché en microscope électronique d'un filament d'actine. (Adapté de Alberts et al. 2008)

b. Cinétique de polymérisation, état stationnaire, concentration 'critique' en monomère

La polymérisation du filament d'actine dépend de facteurs physiologiques tels que la température (Zimmerle et al. 1986), le pH (Zimmerle et al. 1988, Wang et al. 1989) et le niveau de salinité. Du fait de la répulsion électrostatique entre monomères chargés négativement, l'augmentation du niveau de sel accélère la polymérisation par écrantage de ces interactions répulsives (Crevenna et al. 2013).

La génération des filaments s'effectue en trois étapes (Figure 3.A). Il y a tout d'abord une étape de nucléation durant laquelle les monomères s'assemblent spontanément en dimères et trimères instables. Ce dernier, appelé noyau, correspond au plus petit oligomère permettant la polymérisation. La formation de ce noyau est thermodynamiquement limitante dans le processus de polymérisation de par la faible probabilité d'obtenir ce trimère (Lewin et al. 2007, Marks et al. 2008, Figure 3.B). La seconde étape correspond à l'élongation des filaments par ajout de monomères aux deux bouts de l'oligomère. Comme nous le verrons ci-dessous, la vitesse d'élongation est plus rapide au bout barbé qu'au bout pointu et ces vitesses dépendent de la concen-

tration d'actine G présente en solution ainsi que de la nature du nucléotide (ATP, ADP·Pi) associé aux monomères d'actine. Lorsque l'actine G a été suffisamment consommée, atteignant une concentration C_S, le système atteint un état stationnaire résultant d'un équilibre dynamique entre les formes monomérique et filamenteuse de l'actine. La longueur des filaments est alors constante. Si la polymérisation est autorisée aux deux bouts (ce n'est pas toujours le cas, notamment *in vivo*), les filaments suivent alors un régime dit de 'tapis roulant' ou 'treadmilling' en anglais (Figure 5).

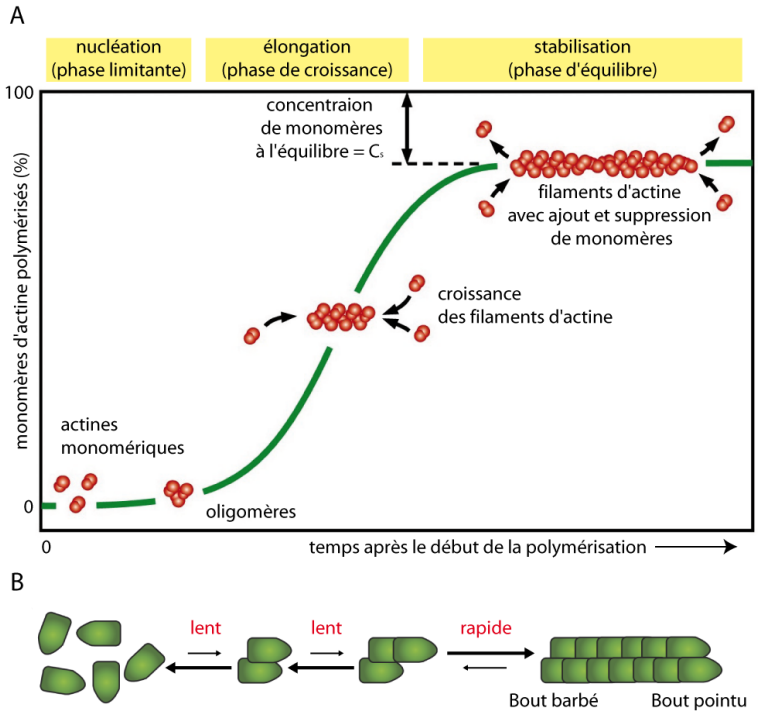


Figure 3 : Dynamique de polymérisation des filaments d'actine. A : Les trois phases de polymérisation. A partir de monomères, les filaments d'actine polymérisent en trois étapes : la nucléation, l'élongation et la stabilisation (Alberts et al. 2008). La cinétique du processus peut être caractérisée expérimentalement en mesurant la consommation des monomères d'actine marqués au pyrène fluorescent (voir page 63). B : Dynamique de nucléation (Weston et al. 2012).

Nous allons décrire maintenant plus finement la dynamique des deux bouts du filament d'actine. Après nucléation, les monomères d'actine peuvent s'associer et se dissocier aux deux bouts du filament mais selon des cinétiques différentes. Le taux d'association k^b_{on} au bout barbé, dit 'extrémité dynamique', est supérieur d'un ordre de grandeur à celui du bout pointu (k^p_{on}) (Figure 4).

Ces taux dépendent de plus de la nature du nucléotide (ATP, ADP, ADP·Pi) associé au monomère. Les effets des nucléotides ATP et ADP·Pi sur la polymérisation de l'actine sont proches (Pollard et al. 2003). Ainsi sur les représentations schématiques, le cas d'une association avec un ADP·Pi n'est pas explicité (Dans la littérature, il existe cependant des études de la polymérisation se basant sur ces trois états de l'actine (Erlenkamper et al. 2013)). Ces nucléotides, comparés à l'ADP, favorisent la polymérisation car les taux d'association sont supérieurs. En considérant des cinétiques de polymérisation du premier ordre, il existe une 'concentration critique' C_C de

monomères à chacun des deux bouts pour laquelle les réactions d'association et de dissociation se compensent. En désignant respectivement les taux d'association et de dissociation k^i_{on} (en $\mu M^{-1}.s^{-1}$) et k^i_{off} (en s^{-1}) (i : indice désignant le bout barbé (b) ou le bout pointu (p), Eq. 1), cet équilibre s'écrit :

$$\frac{d[\text{Actine}_G]}{dt}_{eq} = 0 = k^i_{off} - [\text{Actine}_G]_{eq} \cdot k^i_{on} \qquad \text{Eq. 1}$$

De cette équation, pour chaque état (ATP, ADP·P_i, ou ADP) du nucléotide associé au monomère d'actine, la concentration critique se définit comme :

$$C^i_c = \frac{k^i_{off}}{k^i_{on}} \qquad \text{Eq. 2}$$

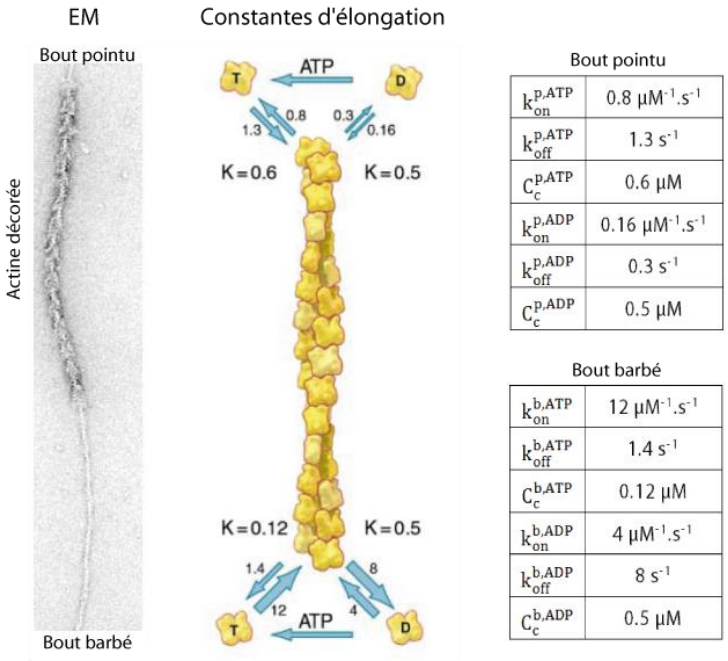


Figure 4 : Dynamique d'élongation du filament d'actine. L'image en microscopie électronique montre un filament partiellement décoré de têtes de myosine (voir page 29), définissant les appellations bout 'barbé' et bout 'pointu' du filament d'actine. L'élongation du filament par des monomères dépourvus de myosines illustre la dynamique d'association plus rapide du bout barbé. Pour les monomères d'actine, les taux d'association sont exprimés en $\mu M^{-1}.s^{-1}$ tandis que les taux de dissociation sont en s^{-1}. Le rapport entre les taux de dissociation et d'association donne la constante d'équilibre de dissociation qui n'est autre que la concentration critique Cc. (Adapté de Pollard et al. 2003). Pour une concentration en actine monomérique de 4 µM et en saturation d'ATP, la vitesse d'élongation au bout barbé est attendue à 4 $\mu m \cdot min^{-1}$.

Dans le cas où l'actine est associée à un seul type de nucléotide (ATP ou ADP), la vitesse de polymérisation dn_b/dt (respectivement dn_p/dt) au bout barbé (respectivement au bout pointu) s'écrit en fonction de la concentration de monomères en solution (Eq. 3 et Eq. 4).

$$\frac{dn_b}{dt} = -k_{off}^{b} + [Actine_G].k_{on}^{b} \qquad \text{Eq. 3}$$

$$\frac{dn_p}{dt} = -k_{off}^{p} + [Actine_G].k_{on}^{p} \qquad \text{Eq. 4}$$

La longueur des filaments est constante dès lors qu'il y a autant de monomères qui sont ajoutés à un bout du filament qu'il y en a qui se dissocient à l'autre bout (Eq. 5).

$$\frac{dn_p}{dt} = -\frac{dn_b}{dt} \qquad \text{Eq. 5}$$

L'état stationnaire est alors atteint pour une concentration C_S de monomères en solution :

$$C_s = \frac{k_{off}^{b} + k_{off}^{p}}{k_{on}^{b} + k_{on}^{p}} \qquad \text{Eq. 6}$$

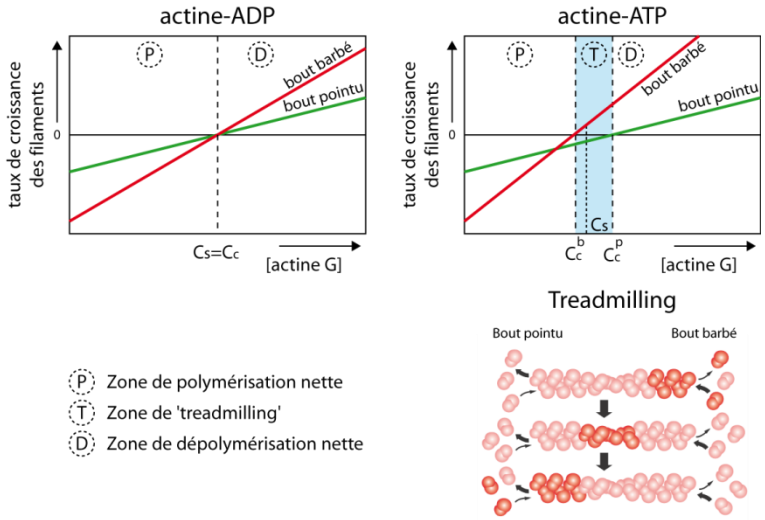


Figure 5 : Equilibre de réaction entre les deux bouts du filament d'actine. En présence d'actine-ADP, les concentrations critiques C_c des deux bouts sont identiques ; à l'état stationnaire la concentration monomérique dans le bain est C_S=C_c et la vitesse de polymérisation à chaque extrémité est nulle. En présence d'actine-ATP, la concentration monomérique C_S à l'état stationnaire se situe entre les concentrations critiques des deux bouts. Un effet de 'tapis roulant' ('treadmilling') apparaît. (adapté de Bray 2001, Alberts et al. 2008)

En présence d'ADP seul, les concentrations critiques à chaque bout sont identiques (Figure 4) et égales à la concentration de monomères à l'état stationnaire C_S ($C_c^{b,ADP} = C_c^{p,ADP} = C_S$). Chaque bout atteint ainsi un équilibre thermodynamique. En revanche, en présence d'ATP, la concentration à l'état stationnaire C_S est encadrée

par les concentrations critiques des bouts ($C_c^{b,ATP} < C_S < C_c^{p,ATP}$). A l'état stationnaire, des monomères viennent s'ajouter au bout barbé tandis que d'autres se détachent du bout pointu, tout en conservant la longueur du filament. Ce phénomène est appelé 'tapis roulant' (ou 'treadmealling' en anglais) (Figure 5). En fait, comme le bout barbé est plus dynamique que le bout pointu, la concentration stationnaire C_S est plus proche de la concentration critique du bout barbé que celle du bout pointu ($C_S \cong 0{,}2$ µM pour de l'actine associée uniquement à l'ATP).

c. Cycle d'ATPase du filament d'actine

L'actine filamenteuse hydrolyse rapidement l'ATP de manière irréversible en ADP·P_i (k_{ATP}= 0,5 s^{-1} pour l'actine Mg^{2+}). La dissociation du groupement phosphate intervient alors après 6 minutes (Figure 6). De même, en excès d'ATP, les monomères actine-ADP, qui sont libérés par le filament d'actine, se transforment rapidement et de manière irréversible (au vu des constances cinétiques de polymérisation) en monomère actine-ATP. Ainsi, l'actine est le siège d'un cycle d'ATPase par l'intermédiaire de la polymérisation et de la dépolymérisation du filament.

Le filament d'actine est ainsi composé d'actine-ATP (actine 'jeune') et d'actine-ADP (actine 'âgée'). L'âge de l'actine (ainsi défini par le nucléotide associé) est un paramètre d'importance car il peut réguler l'affinité et l'activité de certaines protéines associées à l'actine (Blanchoin et al. 1999, Zimmermann et al. 2015).

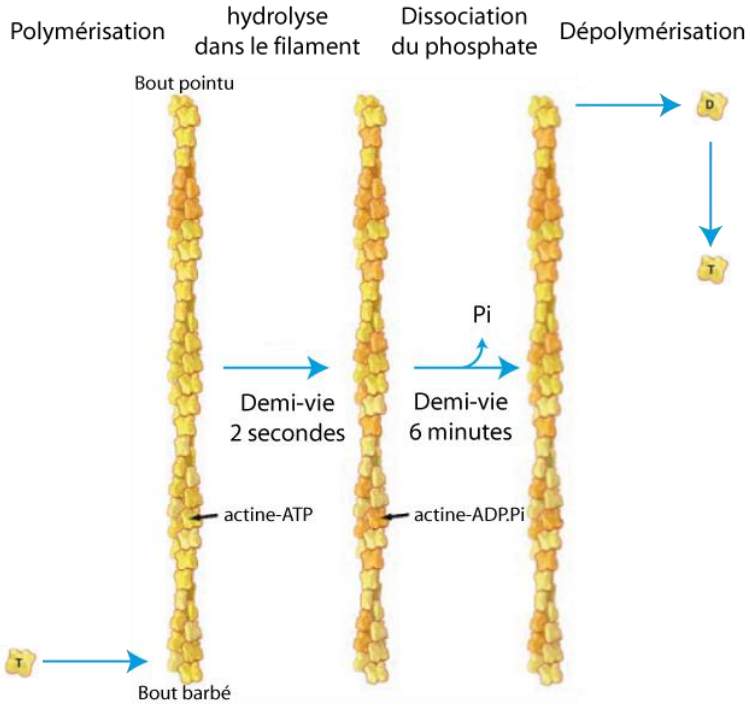


Figure 6 : Cycle d'ATPase du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP en ADP·P_i est un processus rapide mais la dissociation du phosphate est lente. (Adapté de Pollard et al. 2003)

En excès d'ATP, lors d'une dynamique de tapis roulant, la longueur du filament intervient ainsi dans la dynamique majoritaire au bout pointu. En effet, pour

des filaments courts (moins de 200 monomères), l'hydrolyse de la molécule d'ATP n'a pas le temps de se faire. Tout le filament est décoré d'actine-ATP (actine 'jeune'). La dynamique au bout pointu est régie par les constantes cinétiques associées à l'actine-ATP. Ainsi, à l'état stationnaire, la concentration en monomère vaut $C_S \approx 1{,}4\, C_c^b$ et la vitesse du tapis roulant est d'environ 0,6 sous-unité par seconde (i.e. : 100 nm.min^{-1}). A l'échelle cellulaire, les filaments sont plus longs (1 µm=361 sous-unités), ils se trouvent alors dans une configuration où les bouts pointus sont plus susceptibles d'être associés au nucléotide ADP (actine 'âgée') durant le phénomène de tapis roulant. En moyenne, les 200 premiers nucléotides du bout barbé (actine 'jeune') sont ainsi sous forme ATP tandis que les suivants, jusqu'au bout pointu, sont sous forme ADP (actine 'agée'). A l'état stationnaire, la concentration est alors de $C_S \approx 1{,}2\, C_c^b$ et la vitesse du tapis roulant est de 0,3 sous-unité par seconde (i.e. : 50 nm.min^{-1}).

2. Structure et dynamique de l'actine *in vivo*, protéines régulatrices

In vivo, le cytosquelette d'actine présente une dynamique très différente de celle décrite lorsque l'actine est la seule protéine en jeu. Un mouvement de 10 µm du corps des cellules eucaryotes s'effectue en une minute, ce qui implique un renouvellement complet de son cytosquelette dans cet intervalle de temps (Pollard et al. 2003). De même, le renouvellement du réseau d'actine aux bords du lamellipode se produit en 10 secondes (Theriot et al. 1991, Salmon et al. 2002, Watanabe et al. 2002). Ces vitesses de régénération (~1 µm.min^{-1}, Wang 1985) sont aux moins 10 fois plus rapides que l'effet de tapis roulant observé *in vitro* (50 nm.min^{-1}). Au-delà de l'aspect dynamique, la densité et la structure du réseau d'actine sont définies précisément selon la région de la cellule et ne peuvent être le fruit d'une association stochastique des filaments (voir page 21). Le réseau d'actine est en réalité régulé dans le temps et l'espace par diverses protéines dont des protéines d'interaction ('Actin-Binding proteins' (ABPs)) (Lee et al. 2010). Plus d'une soixantaine de familles de protéines interagissant avec l'actine ont été identifiées ; quelques exemples sont illustrés Figure 7. Ces protéines peuvent être distribuées dans 5 catégories différentes selon les fonctions de leurs interactions avec l'actine qui sont :

(1) La nucléation : permet la création rapide de nouveaux filaments (ex : complexe Arp 2/3, formine).
(2) L'assemblage : permet de réguler la cinétique de polymérisation et la source de monomères disponibles (ex : profiline, protéine de coiffe, thymosine).
(3) La stabilisation : permet de maintenir un réseau même à faible concentration de monomères (ex : tropomyosine).
(4) Le désassemblage : permet le recyclage rapide des filaments (ex : ADF cofiline, gelsoline).
(5) Le fagotage et la réticulation : permet de créer des liens entre filaments pour générer des structures aux propriétés géométriques et mécaniques adaptées (ex : fascine, espine, fimbrine, α-actinine).

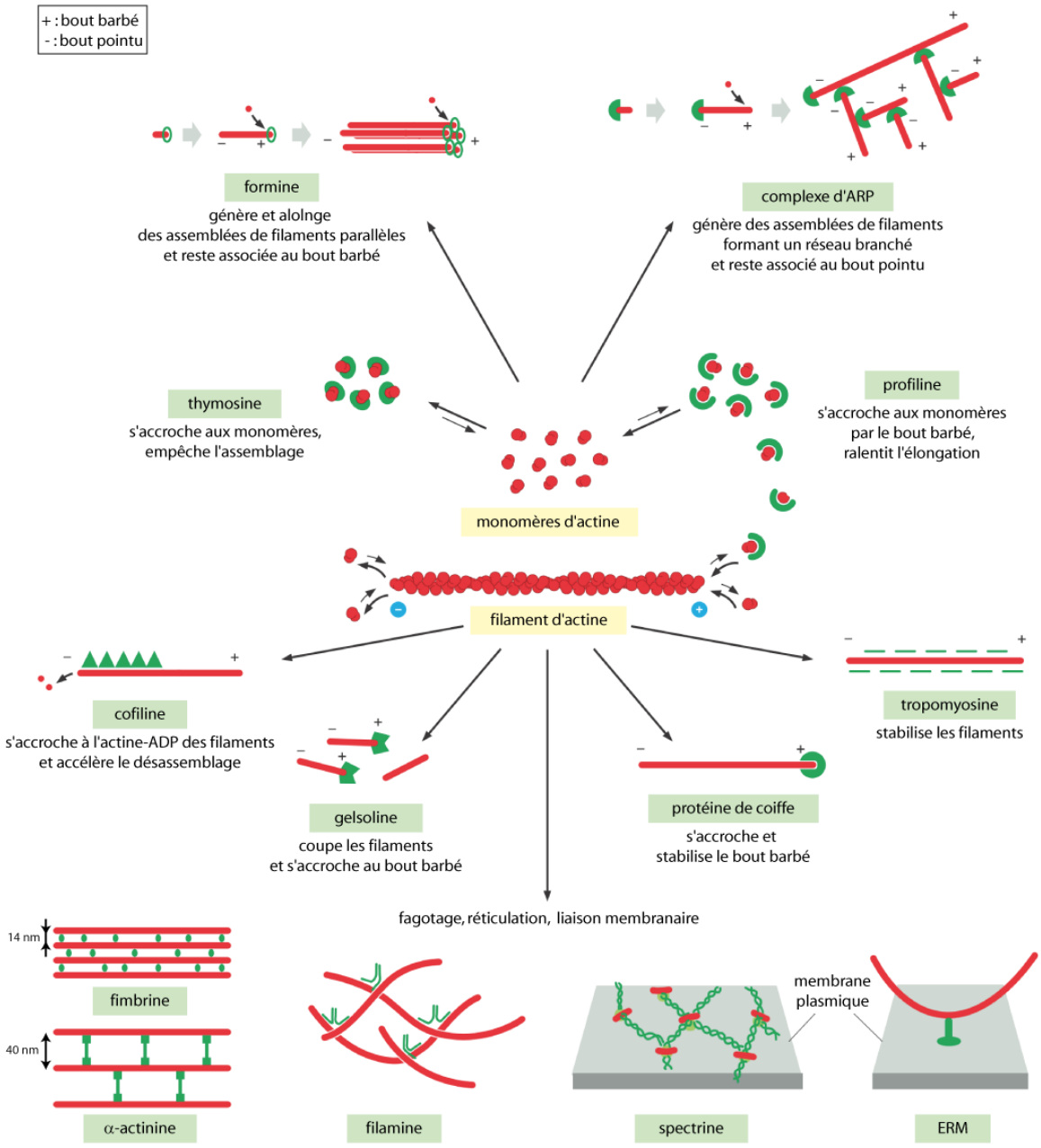


Figure 7 : Illustration des interactions de certaines protéines avec l'actine. (Adapté de Alberts et al. 2008)

Dans la suite, nous décrirons seulement les propriétés des protéines utilisées dans ce travail de thèse.

a. La profiline : régulation de l'assemblage de l'actine

Dans la cellule, l'actine-G peut parfois représenter 50% de la quantité totale de la protéine. La présence d'un tel réservoir est pratique pour un assemblage rapide d'actine-F *de novo*. La concentration en actine monomérique est très supérieure à la concentration C_s (voir Eq. 6) pour laquelle l'actine est dans un état de stationnarité

(150 µM dans le lamellipode, Koestler et al. 2009). Sans régulation de la polymérisation, empêcher l'assemblage spontané de l'actine afin de maintenir ce point de fonctionnement semble impossible. Une petite protéine de 14 kDa permet d'établir un nouvel équilibre entre les formes monomérique et filamenteuse de l'actine : la profiline (Perelroizen et al. 1994, Goldschmidt et al. 1995). Cette molécule vient s'accrocher au bout barbé de l'actine (Schutt et al. 1993) et présente une affinité plus importante pour le monomère (Constante de dissociation K_d= 0,1 µM) que pour le filament (K_d= 20 µM) (Pernier et al. 2016). L'actine-G/profiline change les dynamiques d'assemblage (Figure 8.A) car ce complexe ne peut pas s'associer au bout pointu des filaments, favorisant alors le désassemblage à cette extrémité (Pollard et al. 1984). De plus, la profiline inhibe la formation d'oligomères, autrement dit l'étape de nucléation (Figure 3). Au bout barbé, l'assemblage est toujours permis mais sa cinétique est ralentie car il faut attendre que la profiline se dissocie du bout du filament avant de pouvoir ajouter un nouveau monomère (Pollard et al. 1984, Pernier et al. 2016). Ces changements modifient ainsi les concentrations critiques (Figure 8.B). En présence de 8 µM de profiline, les constantes cinétiques d'association et de dissociation sont respectivement de 8 µM.s^{-1} et de 2 s^{-1} (Gutsche-Perelroizen et al. 1999, Pernier et al. 2016), au lieu de 12 µM.s^{-1} et de 1,4 s^{-1} au bout barbé en excès d'ATP (Figure 4).

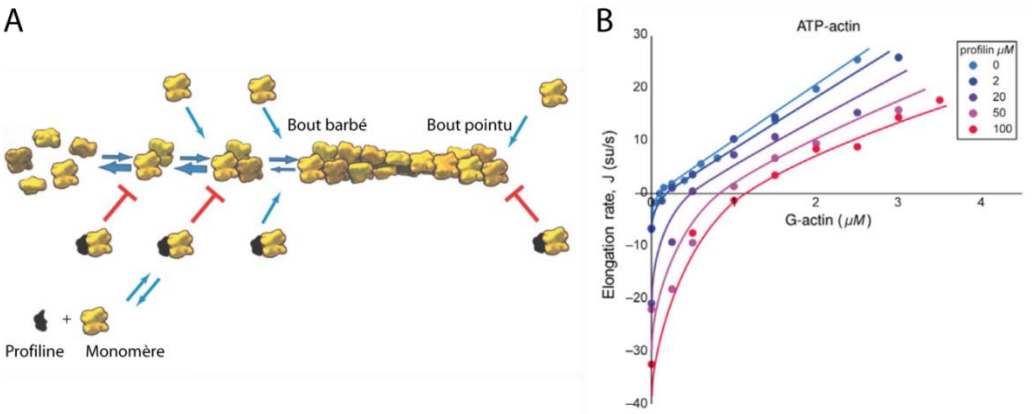


Figure 8 : Effet de la profiline sur la polymérisation de filaments d'actine. A : Représentation schématique du processus de polymérisation. La profiline associée à un monomère d'actine inhibe la nucléation spontanée d'oligomères ainsi que l'assemblage au bout pointu d'un filament préformé (Amann et al. 2000). B : Effet de la profiline sur la vitesse d'élongation *in vitro* des filaments d'actine associée au cation divalent de magnésium et au nucléotide ATP. La concentration en actine monomérique est obtenue par essai pyrène (voir page 63). En présence de profiline, la concentration d'actine-G pour laquelle les filaments atteignent une longueur stationnaire augmente et la constante cinétique d'association des monomères au filament diminue. La vitesse de polymérisation pour une même concentration d'actine monomérique est alors plus faible (Pernier et al. 2016).

In vivo, la concentration de profiline est comprise entre 5 et 100 µM (Pollard et al. 2000, Pernier et al. 2016). Dans la plupart des cas, elle est suffisante pour maintenir une large quantité d'actine (jusqu'à 100 µM) sous forme monomérique. *In vitro*, un ratio de 1 monomère pour 3 molécules de profiline suffit pour décorer la plupart des monomères et ainsi réduire drastiquement la nucléation.

b. Le complexe Arp 2/3 : nucléation de filaments

Pour sonder son environnement ou se déplacer, la cellule a besoin de produire de nouveaux filaments d'actine (Pollard et al. 2003), autrement dit de nouvelles extrémités barbées libres (i.e. : sans protéines bloquantes telles que la profiline ou les protéines de coiffes). Trois stratégies sont possibles. Premièrement, les filaments préexistant peuvent être coupés, augmentant ainsi le nombre de bouts barbés au détriment de la longueur moyenne des filaments. Deuxièmement, les protéines de coiffe bloquant l'élongation peuvent être dissociées. Enfin il est possible de nucléer des filaments *de novo*. *In vivo*, dans de nombreux cas, les nouveaux filaments résultent d'un processus de nucléation (Pollard et al. 2000). L'actine monomérique étant généralement associée à une molécule de profiline, la nucléation n'est pas spontanée mais est catalysée par des protéines nommées 'facteurs de nucléation' (NPF : 'Nucleation Promoting Factor'). La famille des formines et du complexe Arp2/3 en sont deux exemples (Pollard et al. 2003).

Le complexe Arp2/3 est composé de 7 polypeptides (Figure 9.A). Deux d'entre eux, nommés Arp2 et Arp3, ont une structure tridimensionnelle proche du monomère d'actine (Kelleher et al. 1995, Robinson et al. 2001, Alberts et al. 2008). Ensemble, ils forment un hétéro-dimère leur permettant d'amorcer la polymérisation d'un filament d'actine par leurs bouts barbés. Après cette initiation, la polymérisation du filament d'actine ne peut se produire qu'au bout barbé. La conformation native du complexe la rend intrinsèquement inactive ; son taux de nucléation est alors très faible. Néanmoins, la protéine peut être régulée à travers un jeu d'inhibiteur et d'activateur (Krause et al. 2014). Il existe deux catégories de régulation. L'une implique un filament d'actine préexistant comme activateur et l'autre non (Goley et al. 2006, Wagner et al. 2013). Dans la première catégorie, le complexe Arp 2/3 s'accroche par les polypeptides ArpPC2 et ArpPC4 sur le filament préexistant, nommé 'filament mère'. Le nouveau filament produit est quant à lui appelé 'filament fille'. Toutefois, la nouvelle configuration du complexe est encore insuffisante pour le rendre actif. La famille des WASPs (Wiscott-Aldrich syndrom protein) permet alors d'activer le complexe Arp2/3 (Mullins et al. 1998, Machesky et al. 1999).

Les protéines WASP ont trois domaines en commun dans leurs structures : (i) l'α-hélice nommée 'WASP-homology-2' (WH2), qui interagit avec une sous-unité d'actine, (ii) le connecteur nommé 'cofiline-homology ' (C), et (iii) la région acide (A), qui recrute transitoirement (Martin et al. 2006) le complexe Arp2/3 pour l'activer (Machesky et al. 1999, Marchand et al. 2000). Les protéines WASP sont des facteurs multimodulaires qui représentent une structure repliée inactive *in vivo* dans laquelle la partie C-terminale de la protéine est en interaction stable avec la partie N-terminale (Goley et al. 2006). Tout comme le complexe Arp2/3, les protéines WASP peuvent être activées. Les activateurs de WASP sont des protéines de signalisation telles que les RAC, les RHO, les protéines G et les CDC42 (Rohatgi et al. 1999, Krause et al. 2014). *In vitro*, pour supprimer cette régulation, seule la partie activatrice du complexe Arp2/3 est utilisée. Elle renferme les trois structures décrites ci-

dessus et est nommée WH2-C-A ou WA ou VCA. Pour que cette structure soit active il est tout de même nécessaire de la phosphoryler (Ireton 2013). La molécule activée est alors nommée pWA ou pVCA.

Il est intéressant de noter que la nucléation est autocatalytique. Le nombre de bouts barbés créés évolue de manière exponentielle. Le réseau produit une arborescence et est nommé 'réseau branché' ou 'dendritique' (Blanchoin et al. 2000).

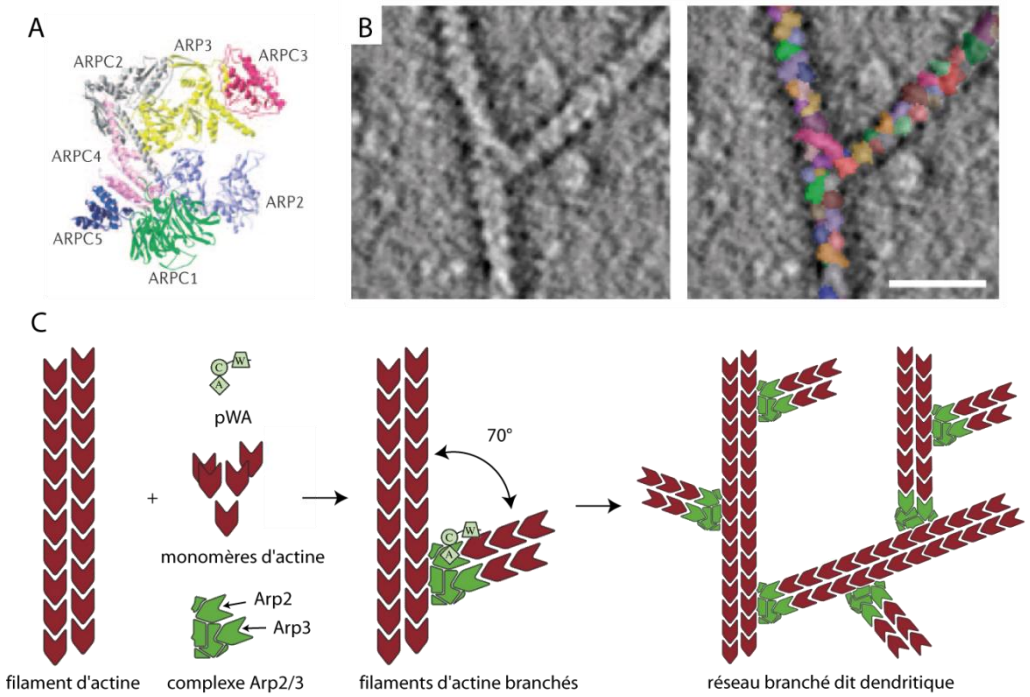


Figure 9 : Le complexe Arp2/3. A : structure cristalline du complexe Arp2/3 (Goley et al. 2006). B : Cliché au microscope électronique d'un branchement de filaments d'actine par le complexe Arp2/3. A droite, les monomères d'actine et le complexe Arp2/3 sont colorisés afin de mieux les distinguer. (Rouiller et al. 2008). C : Schéma de polymérisation de réseaux de filaments d'actine en présence du complexe Arp2/3 et d'un de ses activateurs le pWA (Adapté de Insall et al. 2009, Ireton 2013)

c. La phalloïdine : stabilisation de filaments

Dans la cellule il existe des protéines pour empêcher la dépolymérisation des filaments. La tropomyosine en est un exemple et joue un rôle crucial dans la régulation de la contraction musculaire (Vilfan 2001). *In vitro*, ces protéines stabilisatrices permettent de travailler à de faibles concentrations en actine-G, voire avec un seul filament. Dans l'étude de l'activité de moteurs moléculaires avec des filaments d'actine, la tropomyosine n'est généralement pas utilisée car elle masque les sites d'interaction entre ces protéines (Lehman et al. 1994). La plupart du temps, ce n'est pas une protéine mais une toxine qui est employée pour stabiliser les filaments : la phalloïdine. Ce léger composé de 0,8 kDa est extrait de champignons tels que l'Amanita phalloïde, l'Amanita verna et la Galerina marginata.

La phalloïdine s'accroche exclusivement à l'actine filamenteuse car elle interagit avec deux sous-unités d'actine (Figure 10). Elle empêche ainsi la dissociation des sous-unités et interrompt par conséquent le cycle d'hydrolyse de l'ATP. En empêchant la dépolymérisation, elle favorise l'élongation des filaments (Coluccio et al. 1984). Un filament entièrement décoré par cette toxine est composé d'autant de sous-unités d'actine que de molécules de phalloïdine (ratio 1:1) (Figure 10).

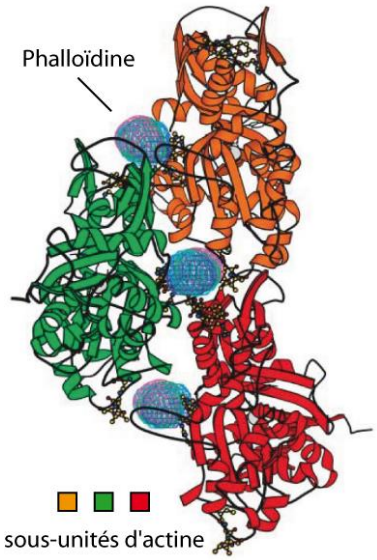


Figure 10 : Illustration de la position des molécules de phalloïdine dans le filament d'actine. (Oda et al. 2005)

3. La diversité des architectures d'actine dans le cytosquelette cellulaire

La cellule est capable, à l'aide de protéines de signalisation et d'échafaudage, d'activer et de distribuer spatialement toute une variété de protéines régulant la polymérisation de l'actine (ABPs) (Chhabra et al. 2007). Le complexe Arp2/3 ou la formine en sont des exemples. Cette régulation permet de développer à tout instant et localement des réseaux dynamiques de composition et d'architecture complexes. *In vivo*, il existe trois types de réseaux fondamentaux de filaments d'actine : les réseaux parallèles, antiparallèles et désordonnés (Figure 11).

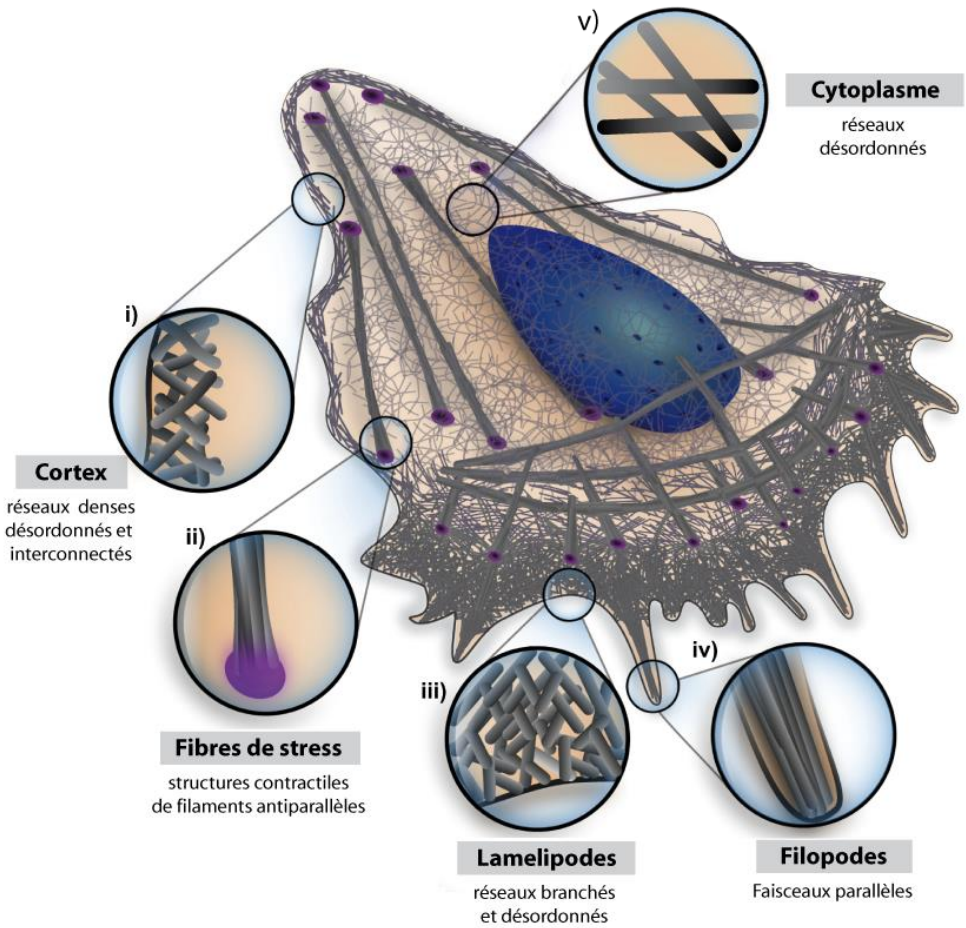


Figure 11 : Diversité des réseaux de filaments d'actine dans la cellule eucaryote. (Adapté de Blanchoin et al. 2014)

a. Le réseau parallèle

Le réseau parallèle est constitué d'un ensemble de filaments d'actine parallèles de même polarité. Ce type de structure est par exemple observé dans des protrusions cellulaires cylindriques fines qui permettent à travers l'augmentation des surfaces d'intervenir dans différents processus comme la mécanotransduction, les échanges entre les milieux extra et intra cellulaires ou l'adhésion. Un réseau parallèle est ainsi observé au niveau des microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin et des cellules mécanosensorielles ciliées de l'oreille interne. La structure du réseau est maintenue par des ABPs telles que la villine, la fimbrine, l'espine (facteurs de réticulation) et les myosines I, II ou XV (moteurs moléculaires) (Michalski et al. 2007, Alberts et al. 2008). Les filopodes de la cellule fournissent un autre exemple. Leur formation dépend de formines (facteurs de nucléation) et de fascines (facteurs liants) ainsi que de l'activité motrice de la myosine X, servant de transporteur de nouvelles protéines au sommet du filopode (Mattila et al. 2008).

b. Le réseau antiparallèle

Le réseau antiparallèle est également constitué d'un groupe de filaments parallèles mais de polarités aléatoires. Cette organisation permet la contraction du réseau par un glissement des filaments les uns par rapport aux autres. La structure du sarcomère, élément de base des muscles striés, en est l'exemple classique. L'activité de myosines II, organisées en filaments 'épais' bipolaires de plusieurs dizaines de molécules motrices, permet de produire le travail mécanique nécessaire à la contraction (Alberts et al. 2008). Les fibres de stress de la cellule présentent également une structure antiparallèle renfermant entre 10 et 30 filaments liés par de l'α-actinine (facteur de réticulation). Ces fibres jouent un rôle important dans l'adhésion, la migration, la morphogenèse et la mécanotransduction de la cellule par l'intermédiaire de la myosine II non musculaire (Tojkander et al. 2012).

c. Le réseau désordonné ('actin meshwork')

Il existe divers réseaux désordonnés ('actin meshwork' en anglais) de filaments d'actine enchevêtrés, selon la nature des ABPs impliquées. Par exemple, le complexe Arp2/3 génère des réseaux dits 'branchés' (i.e. : dendritiques). Le lamellipode est une structure dynamique illustrant ce type de structure. Il s'agit d'une protrusion cellulaire impliquée dans le déplacement des cellules motiles. Elle se situe au bord avant de ces dernières et est étalée sur 10 microns en largeur, sur 3 à 5 microns en longueur et sur environs 100 nm en épaisseur. La dynamique de ce réseau n'est pas exclusivement liée au complexe Arp2/3 mais à un cocktail d'ABPs comprenant des protéines de coiffe (facteur inhibiteur de polymérisation), d'ADF/Cofilines (facteur de dépolymérisation), de tropomyosines (facteur stabilisateur des filaments) (Pollard et al. 2003). Le lamellipode a la particularité d'être globalement polarisé. Une zone barbée peut être définie vers le bord avant de la cellule et une zone pointue vers l'intérieur (Sivaramakrishnan et al. 2009). Cet aspect permet à des myosines, comme les myosines V et VI, de transporter des vésicules ou organelles dans une direction privilégiée de la structure (Brawley et al. 2009).

Il existe également des réseaux désordonnés interconnectés denses comme dans le cortex cellulaire (bord de la cellule). Sa structure permet la déformation de la cellule par l'intermédiaire de myosines II, notamment lors de la mitose (division cellulaire). Un réseau de filaments d'actine interconnecté moins dense se trouve également dans le cytoplasme. L'activité stochastique de moteurs moléculaires, comme la myosine V, peut agiter le réseau d'actine et faire diffuser activement des particules inertes dans le réseau. Ce phénomène de diffusion active permet d'explorer l'environnement plus rapidement qu'une diffusion à l'équilibre thermodynamique (Brangwynne et al. 2009, Bruno et al. 2009, Guo et al. 2014, Chaigne et al. 2016).

4. Les réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée *in vitro*

In vivo, les réseaux de filaments d'actine sont complexes et décrypter le rôle de leur structure sur le comportement des moteurs reste un exercice difficile. Dans une

optique de simplification, et afin d'identifier des comportements généraux, Laurent Blanchoin et Manuel Thery ont développé une approche *in vitro* originale permettant de fabriquer des réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée. La technique a été mise au point au CEA de Grenoble au cours de la thèse d'Anne-Cécile Reymann en 2010 (Reymann et al. 2010) et est à la base de ce travaille de thèse.

Il s'agit d'initier la polymérisation de l'actine à partir de surfaces de géométrie prédéfinie (Figure 12). Par la suite, nous appellerons 'motifs' ces régions d'intérêts de la surface. En plus des composants minimaux nécessaires à la polymérisation de filaments d'actine (monomère d'actine, ATP, etc.), trois autres protéines sont utilisées : le complexe Arp2/3, le NPF ('Nucleation Promoting Factor') pWA et la profiline.

Le dépôt de pWA sur les motifs permet d'activer localement le complexe Arp2/3 présent en solution. Sur le motif, à partir des filaments préformés, de nouveaux filaments polymérisent en générant un réseau branché. Dans un second temps, ces filaments 'sortent' du motif (Figure 12, Figure 13, Figure 14). Dans le cas particulier d'une barre de nucléation, leur direction en est normale (Figure 12). Il est également à noter qu'il est nécessaire d'avoir quelques filaments d'actine en solution pour servir de précurseurs à la polymérisation sur motif.

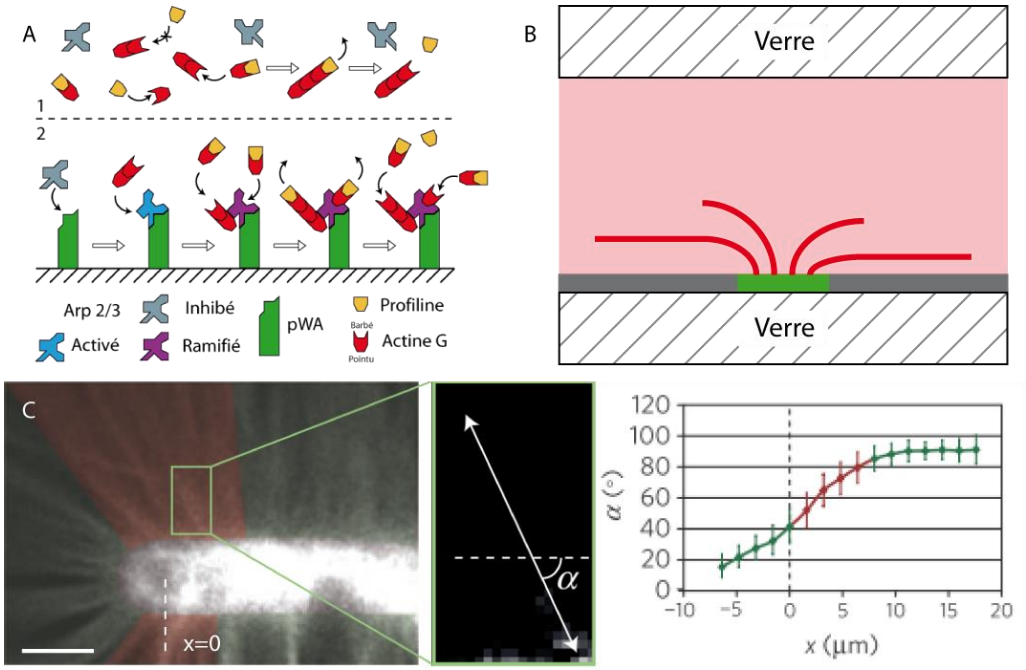


Figure 12 : Nucléation d'actine sur motif. A : schéma de polymérisation en volume (1) et en surface (2). **B** : schéma des réseaux de filaments d'actine polymérisés à partir de motifs 2D (Gris : PLL-g-PEG (passivateur), Vert : pWA. Rouge : actine (monomérique et filamenteuse). **C** : exemple d'un réseau d'actine polymérisé à partir d'un segment visualisé en fluorescence. Echelle 10 µm. L'angle α est la direction des filaments définie par rapport à l'axe principal de la barre (Adapté de Reymann et al. 2010).

Durant la création du réseau, une compétition s'opère entre la polymérisation en surface et en solution. La première dynamique doit être dominante. La profiline est ainsi utilisée à une concentration trois fois supérieure à celle des monomères d'actine, ce qui permet de limiter la formation de trimères d'actine, et donc de filaments en solution (Pollard et al. 1984). Dans une certaine mesure, l'augmentation du nombre

de molécules de pWA ou du complexe Arp2/3 favorisera la polymérisation en surface. Il est à noter que la polymérisation de filaments à partir du complexe Arp2/3 est un processus auto-catalytique : quelques filaments préformés suffisent pour obtenir un réseau dense.

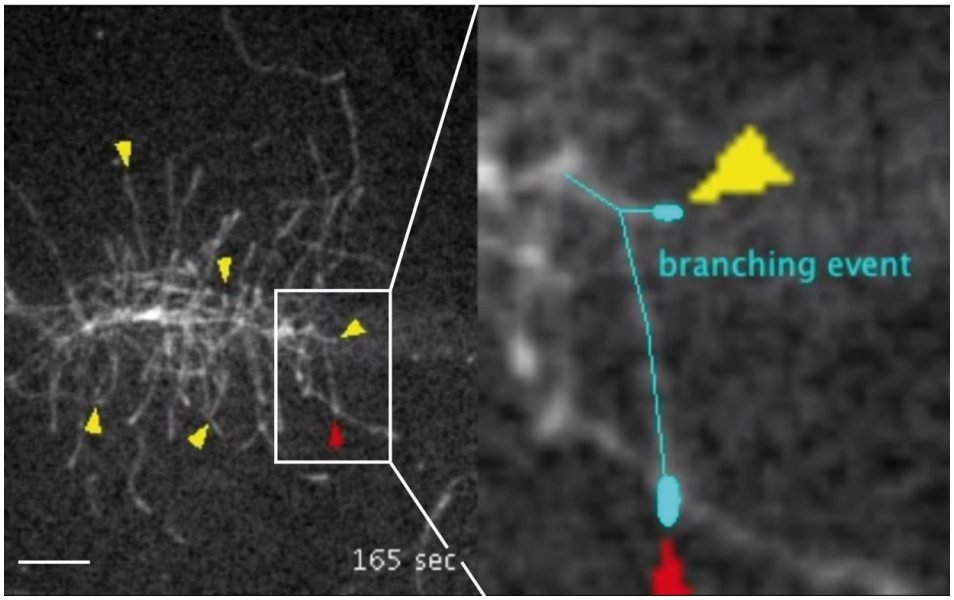


Figure 13 : Polymérisation des filaments d'actine près d'une ligne horizontale de NPF. Les filaments d'actine sont visualisés en fluorescence. Les triangles montrent les bouts barbés des filaments. Echelle 10 µm (Reymann et al. 2010).

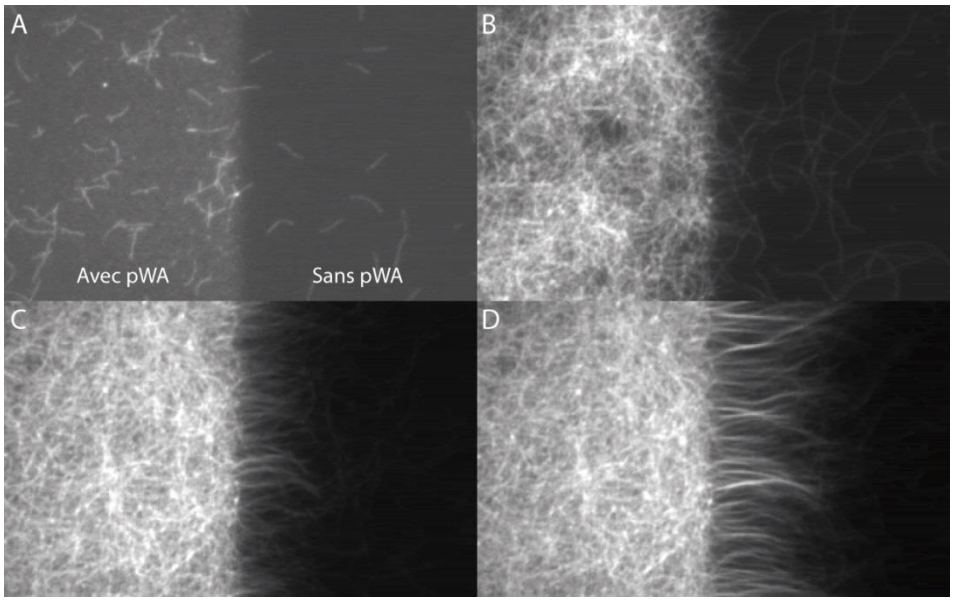


Figure 14 : Polymérisation d'un réseau de filaments d'actine à partir d'une surface de NPF. Les filaments d'actine sont visualisés en fluorescence. De A à D les temps d'acquisition sont espacés régulièrement (Source : Laurent Blanchoin, CEA de Grenoble).

L'utilisation du complexe Arp2/3 procure un autre avantage : la polymérisation des filaments d'actine ne se fait que par le bout barbé. Les filaments 'sortant' du motif ont alors leurs bouts barbés dirigés vers l'extérieur et leur croissance se fait par ajout de monomères à ce bout (Figure 15).

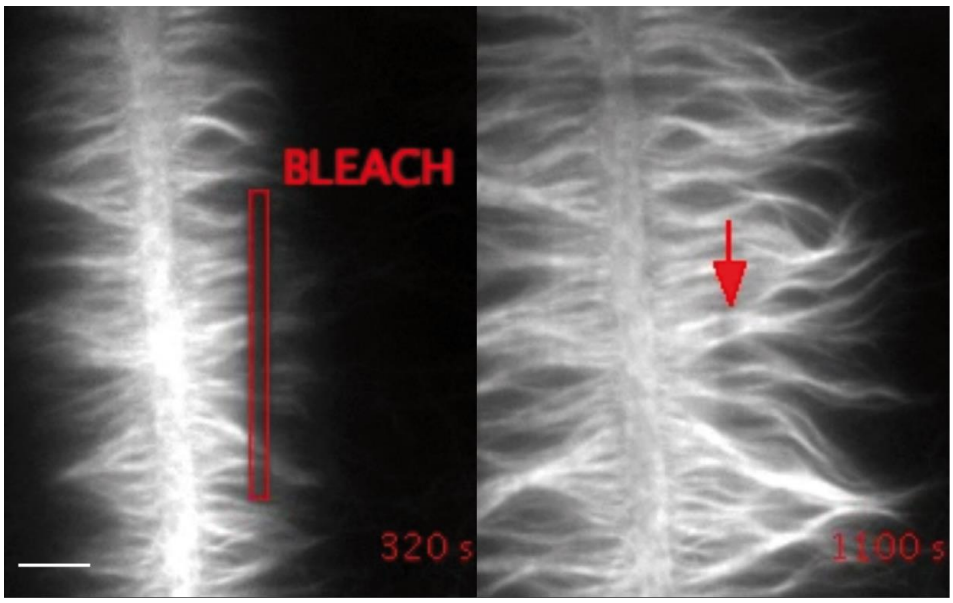


Figure 15 : Localisation des bouts barbés des filaments d'actine. Blanc : visualisation en fluorescence des filaments d'actine polymérisés à partir d'une ligne de nucléation. A gauche : photo-blanchiment par laser sur un rectangle (rouge). A droite : Visualisation du photo-blanchiment au même lieu après un temps de 780 secondes. La fluorescence de la zone photo-blanchie n'a pas bougé, donc il n'y a pas de mouvement global de l'actine. Par contre, les filaments se sont allongés, preuve que les monomères se rajoutent aux bouts situés dans la zone distale, et donc que les bout barbés se trouvent dans cette région (les bouts pointus sont sur la ligne de nucléation). Echelle 10 µm (Reymann et al. 2010).

Outre le choix des motifs, le choix des concentrations des protéines joue un rôle important pour déterminer la densité ou la longueur des filaments d'actine du réseau. De manière évidente, plus nous mettons de monomères d'actine plus la longueur des filaments visibles est grande et plus le réseau est dense (Figure 16). L'ajout supplémentaire de complexes d'Arp2/3 permet d'obtenir des réseaux plus denses mais avec des filaments plus courts (Reymann et al. 2010). Une quantité trop faible de pWA conduit à des motifs de nucléation non homogènes et entraînera des réseaux denses se regroupant en dehors des motifs en faisceau.

Quant à la profiline, en plus de limiter la nucléation (formation de trimères) de la polymérisation en volume, elle réduit la vitesse de polymérisation (Pollard et al. 1984, Gutsche-Perelroizen et al. 1999). Ainsi elle génère des réseaux plus denses et des filaments plus courts.

Dans ces expériences, le bain de polymérisation contient de la méthylcellulose. Cette macromolécule augmente la viscosité d'un milieu et 'plaque' les filaments d'actine sur la surface par exclusion stérique (déplétion). Ainsi le réseau d'actine s'organise en un feuillet d'environ 200nm d'épaisseur (Letort et al. 2015). Nous l'approximerons par la suite à un réseau à deux dimensions. A plus forte concentration en méthylcellulose, les réseaux de filaments d'actine se regroupent en faisceau (Figure 17).

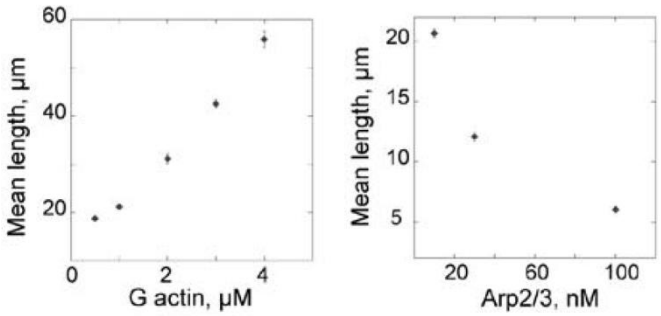


Figure 16 : Effet de l'actine G et du complexe Arp2/3 sur la longueur des filaments. Cette distance correspond à la longueur des plus longs filaments visibles sur une image en microscopie de fluorescence du réseau. (Reymann et al. 2010)

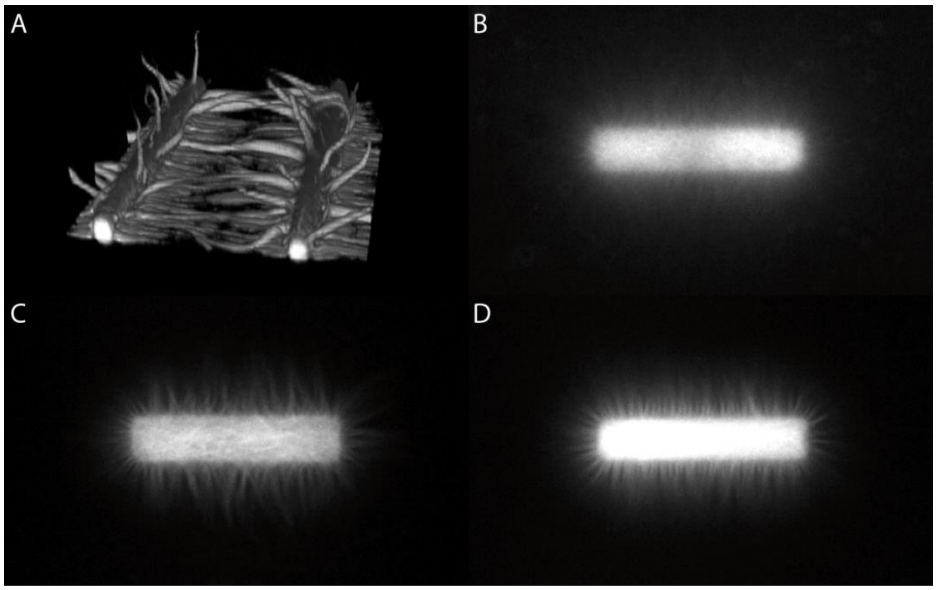


Figure 17 : Effet de la méthylcellulose sur le réseau de filaments d'actine *in vitro*. A : vue tridimensionnelle d'un réseau de filaments d'actine après 30 minutes de polymérisation à partir de deux lignes de pWA de 3 µm de largeur et espacées de 40 µm pour une viscosité (macroscopique) de 800 cPs. B à D : réseau de filaments d'actine après 15 min de polymérisation à partir d'un segment de pWA de 5 µm de largeur et long de 30 µm pour une viscosité de 400 cPs (B), 800 cPs (C) et 1600 cPs (D). Expérience réalisée au cours de cette thèse.

B La myosine

Les moteurs moléculaires sont des protéines qui ont la capacité d'utiliser l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour fournir un travail mécanique. Les moteurs interagissent généralement avec les filaments du cytosquelette. Les kinésines et les dynéines sont ainsi associées aux microtubules et interviennent dans des fonctions mécaniques essentielles, comme la division cellulaire, le battement des flagelles, ou le transport intracellulaire. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux moteurs en interaction avec les filaments d'actine, les myosines. En 1864, Kühne extrait du muscle la toute première myosine qui fut étudiée et qui est généralement désignée comme la 'myosine conventionnelle'. Elle fut plus tard nommée myosine II (Szent-

Gyorgyi 2004). Il existe de multiples types de myosines, regroupés dans un arbre phylogénique comportant dix-sept sous-familles (Figure 18).

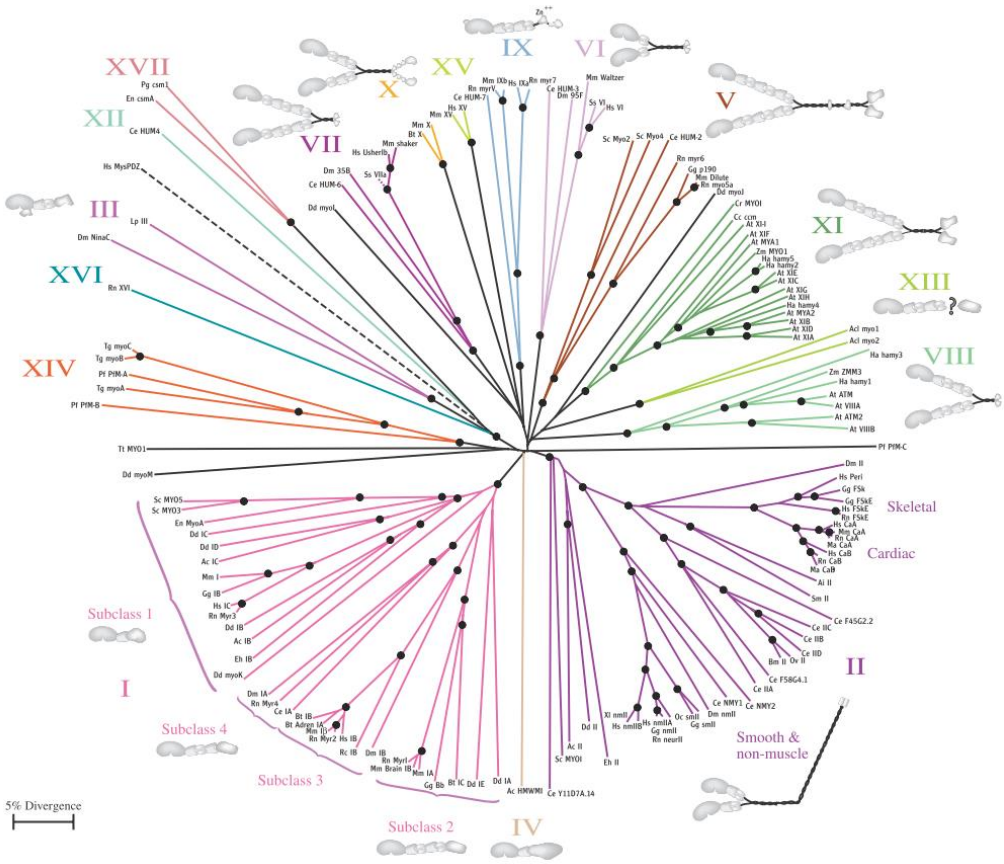


Figure 18 : Arbre phylogénique de la myosine (Hodge et al. 2000)

Dans cette thèse, nous considérons la myosine II squelettique, la myosine V et la myosine VI. Ces trois types de moteurs seront utilisés pour illustrer les différentes caractéristiques motrices de la myosine. Un récapitulatif de leurs différentes propriétés est présenté en fin de chapitre (voir page 44).

1. Fonctions de la myosine

Les myosines sont impliquées dans trois grandes classes de processus (Tab. 1). L'une de ces catégories concerne le transport intracellulaire de cargos composé de deux mécanismes distincts. D'une part, les cargos se déplacent dans un mouvement dirigé le long des filaments d'actine. Le transport d'organelle par la myosine V en est un exemple (Hammer et al. 2012), tout comme le transport membranaire durant la cytokinèse par les myosines V ou VI (Arden et al. 2007). D'autre part, les cargos inertes sont déplacés par l'intermédiaire d'un réseau de filaments d'actine agité activement par les moteurs. L'agitation du 'gel acto-myosine' conduit à de la diffusion active. Lors de la méiose de la cellule zygote de souris, une diffusion de ce type, fondée sur l'activité de la myosine V, permet de centrer grossièrement les pronucléi par l'intermédiaire d'un gradient de vésicules actives (Chaigne et al. 2016). Dans la cellule, les myosines V et II permettent d'obtenir des organites hyperdiffusifs permettant

une exploration rapide de l'environnement (Guo et al. 2014, Bruno et al. 2009). De manière générale, les myosines V et VI se présentent comme des moteurs de transport. Fonctionnellement, la myosine VI est un moteur proche de la myosine V à une seule exception : son sens singulier de déplacement vers le bout pointu des filaments d'actine (ce sens de déplacement se retrouve uniquement avec la myosine IX (Inoue et al. 2002)).

La deuxième catégorie de processus actifs implique une réorganisation du réseau d'actine dans lequel les myosines font glisser les filaments les uns par rapport aux autres pour contracter le réseau. La myosine II est connue principalement pour son implication dans la contraction des fibres musculaires. Elle est présente, sous différentes isoformes, dans l'ensemble des muscles (Alberts et al. 1994). La myosine II génère aussi des forces dans le cortex cellulaire (Bray et al. 1988, Salbreux et al. 2007). Ces forces jouent un rôle fondamental dans la migration cellulaire et dans la cytokinèse. Aussi, elles aident, durant la mitose, au positionnement de cargos (Chaigne et al. 2016). La contraction cellulaire est également à l'origine de phénomènes de flux de protéines (Cai et al. 2006).

La troisième catégorie de processus actif concerne des fonctions de maintien de tensions permettant la préservation d'une structure. Par exemple, la myosine VI est responsable du maintien de la forme géométrique du stéréocil de l'oreille interne (Avraham et al. 1995). Elle permet également de renforcer l'adhésion entre cellules (Maddugoda et al. 2007). Il est à noter que ces myosines jouent le rôle d'ancre ('catch bond' voir page 40).

Type de Fonction	Myosine II	Myosine V	Myosine VI
Transport	Transport de vésicules (Golgi). (*)	Transport de vésicules (Golgi, ER, Lysosome, Mélanose). (*)	Transport de vésicules (Golgi, Mitochondrial). (*)
Contraction	- Contraction du muscle - Cytokinèse (fibre sous tension)		
Maintien de tensions			Maintien de la forme géométrique du stéréocil. (**)

Tab. 1 : Exemple de fonctions des myosines II, V et VI. (*) : Depina et al. 1999. (**) : Avraham et al. 1995.

2. Structure de la myosine et états conformationnels

Les myosines sont composées grossièrement de trois domaines : la tête, le cou et la queue. Contrairement aux myosines monomériques I, III et IX, certaines peuvent

s'associer en dimères par entrelacement hélicoïdal de leurs queues (Figure 18). Les myosines II, V et VI, qui nous intéressent ici, en sont des exemples.

Selon la myosine, la queue peut avoir différentes fonctions. Pour certaines myosines de 'transport' comme les myosines V et VI, la queue présente à son extrémité un site permettant l'accroche de cargos (Alberts et al. 2008). Quant aux myosines II, elles peuvent par l'intermédiaire d'une partie de leurs queues (la LMM, voir paragraphe ci-dessous) former des filaments bipolaires de plusieurs dizaines de molécules (Figure 19.B). Comme nous l'avons déjà indiqué, de tels filaments sont responsables, entre autres, de la contraction musculaire (Batters et al. 2014). Pour éviter, dans les expériences *in vitro*, l'auto-assemblage des myosines, la chymotrypsine est utilisée pour couper une partie de la queue du dimère.

En présence de chymotrypsine, le dimère se coupe en deux sous-fragments : la méromyosine lourde ('Heavy Mero-Myosin' (HMM)) et la méromyosine légère (Light Mero-Myosin (LMM)). La HMM comporte les deux têtes, les deux cous ainsi qu'une partie de la queue du dimère. Le reste de la queue n'est autre que la LMM. La HMM peut être séparée en deux sous unités S1 et S2 à l'aide de la papaïne. Le fragment S1 comporte uniquement la tête et le cou de la myosine (Figure 19) (Lowey et al. 1968, Margossian et al. 1982, Coureux et al. 2003, Menetrey et al. 2007).

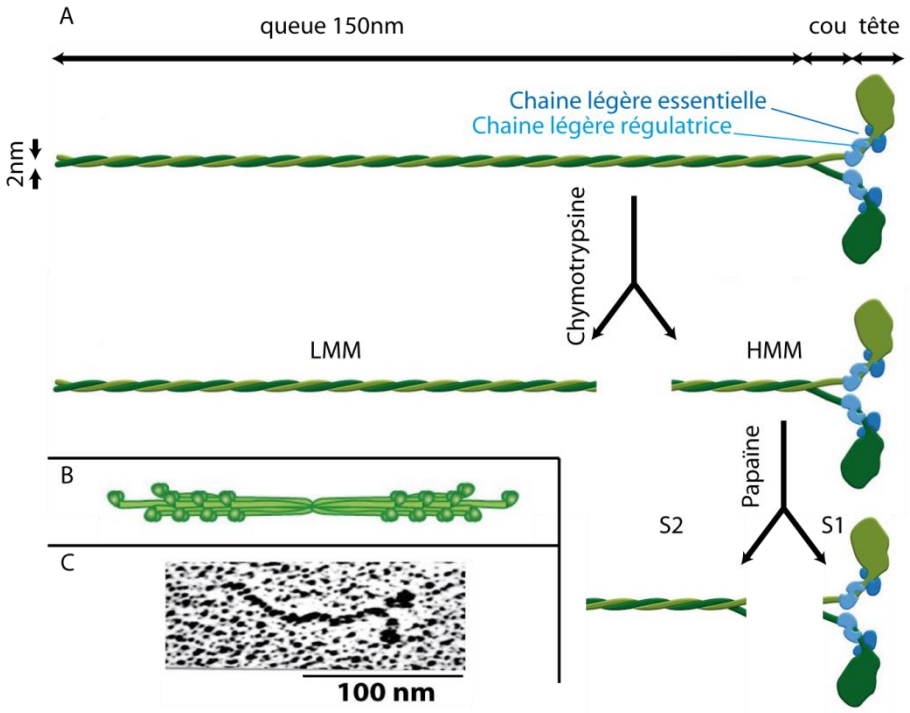


Figure 19 : Fragments protéolytiques de la myosine II. A : représentation schématique de la myosine après protéolyse par la chymotrypsine puis la papaïne. B : représentation schématique d'un filament bipolaire de myosines II. C : cliché en microscopie électronique de la myosine II. (Adapté de Alberts et al. 2008)

Dans toutes les myosines, le sous-fragment S1 (tête et cou) renferme le domaine catalytique de l'hydrolyse de la molécule d'ATP (Figure 21, A). Elle se décompose généralement en trois domaines : le supérieur et l'inférieur, de taille égale de 50 kDa, et un domaine comportant sa terminaison N-terminale. Le site de fixation de la molécule d'ATP se localise dans le domaine supérieur. Ces domaines inférieur et supérieur contiennent aussi les sites d'accrochage au filament d'actine. Cette accrochage nécessite deux monomères d'actine du filament (Preller et al. 2013). La myosine présente deux états (principaux) conformationnels : le cou est en effet relié à la tête par l'intermédiaire d'un convertisseur qui change de configuration structurelle lors de l'hydrolyse de l'ATP. Le cou, qui est composé d'une hélice α stabilisée par des chaines légères, montre alors un mouvement de pivot qui, par un effet de bras de levier, accentue celui du convertisseur (Ruff et al. 2001) : la terminaison C-terminale située au bout du sous-fragment S1 présente un déplacement δ de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres (Figure 21.B). Ce déplacement, appelé 'power stroke' en anglais et que nous traduisons par 'coup de force', dépend de la longueur L du bras de levier (Figure 20) et de la rotation θ résultant du changement conformationnel du convertisseur (Figure 21, B) (en première approximation : $\delta=2L\sin(\theta/2)$). Ces deux paramètres produisent une grande variabilité du déplacement δ du bout du sous-fragment S1 selon la myosine considérée. Les myosines II et V présentent une rotation absolue de 70° très inférieure aux 180° de la myosine VI (Spudich et al. 2010). Cependant, les sous-fragments S1 des myosines II et VI comportent, relativement à la myosine V, un faible bras de levier. Le déplacement δ est ainsi de 5 nm pour la myosine II (Molloy et al. 1995) tandis qu'elle est quasi-similaire pour les myosines V et VI : 25 nm pour la myosine V (Veigel et al. 2002) et 30 nm pour la myosine VI (Morris et al. 2003).

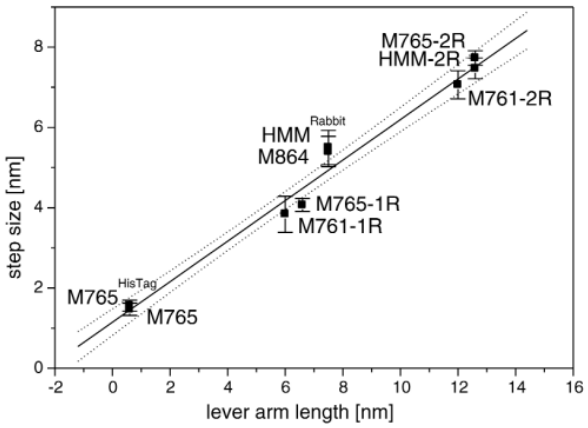


Figure 20 : Effet du bras de levier selon la longueur du cou de la myosine II. Le pas du moteur est proportionnel à la longueur du cou. En pointillé : intervalle de confiance à 95% (Ruff et al. 2001).

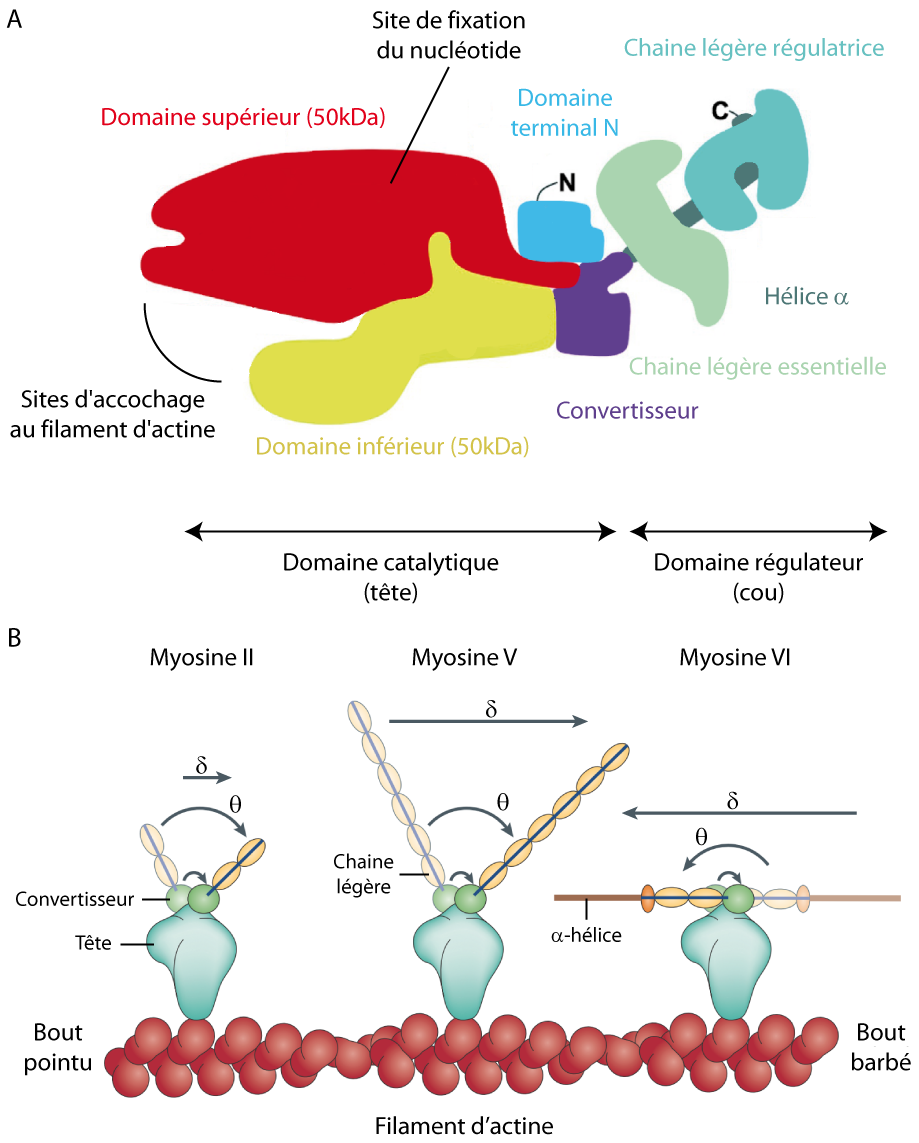


Figure 21 : Structure schématique du sous-fragment S1 de la myosine. A : structure schématique détaillée du sous-fragment S1 (Adapté de Preller et al. 2013). Les myosines V et VI présentent la même architecture à l'exception des chaines légères, la première en possède six tandis que la seconde en possède deux (Coureux et al. 2003, Menetrey et al. 2007, Spudich et al. 2010). B : représentation schématique de l'effet de bras de levier selon la myosine (myosine II, V et VI) (Adapté de Spudich et al. 2010). Les myosines II et V suivent le même schéma tout comme la myosine VI à l'exception près que la rotation du bras de levier s'effectue dans le sens opposé.

3. Cycle d'hydrolyse de l'ATP et rapport de charge

La myosine a la capacité à la fois d'hydrolyser l'ATP et de s'accrocher au filament d'actine. Le cycle d'hydrolyse peut suivre différents chemins biochimiques (Figure 22) dont il a été possible de mesurer les différentes constantes cinétiques (myosine II : Howard 2001, myosine V : De La Cruz et al. 1999, De La Cruz et al. 2000, myosine VI : De La Cruz et al. 2001). Le chemin le plus probable correspond aux transitions les plus rapides entre les différents intermédiaires réactionnels. L'actine est un catalyseur de l'hydrolyse de l'ATP ; le taux d'hydrolyse de la molécule d'ATP par la myosine II passe en effet de 0,1s^{-1} à 25s^{-1} en présence d'actine (Howard 2001). Le cycle d'ATPase le plus probable peut se décrire comme suit. Partons de l'état dans lequel la myosine n'est liée à aucun nucléotide (l'état *rigor mortis*). La myosine est alors fortement accrochée au filament d'actine. La fixation d'une molécule d'ATP provoque le décrochage de la myosine. Suit une étape d'hydrolyse, qui conduit à l'accrochage (interaction faible) de la myosine à l'actine, puis la libération d'un phosphate, dans un état maintenant fortement accroché, suivie de celle de la molécule d'ADP restante. La myosine se retrouve alors dans son état initial.

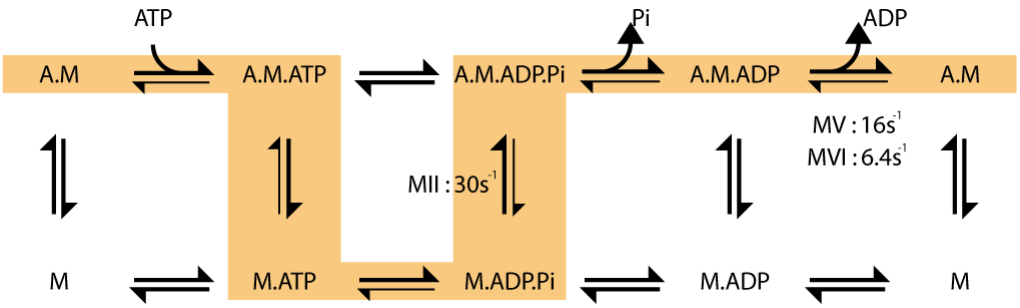


Figure 22 : cycle d'hydrolyse d'une molécule d'ATP par l'intermédiaire d'un système acto-myosine. La première ligne correspond à une myosine accrochée à un filament d'actine contrairement à la seconde. Orange : chemin le plus probable. 'A' : filament d'actine, 'M' : myosine. Le taux des étapes limitantes du cycle est indiqué pour la myosine II (Howard 2001), la myosine V (De La Cruz et al. 1999) et la myosine VI (De La Cruz et al. 2001).

Le taux d'ATPase k_{ATP}, correspondant au nombre de molécules d'ATP hydrolysées par seconde par la myosine, varie selon le moteur. Il vaut 25 s^{-1} pour la myosine II (Howard 2001), 10 s^{-1} pour la myosine V (Rief et al. 2000, Veigel et al. 2002) et 8,3 s^{-1} pour la myosine VI (De La Cruz et al. 2009) dans des conditions de saturation de filaments d'actine et d'ATP. Les taux d'accrochage k_{on} et de décrochage k_{off} de la myosine au filament d'actine sont reliés au taux d'ATPase k_{ATP} (Eq. 7) ainsi qu'aux durées moyennes d'attachement τ_{on} et de détachement τ_{off} (Eq. 8).

$$k_{ATP} = \frac{k_{on}\, k_{off}}{k_{on} + k_{off}} = \frac{1}{\tau_{on} + \tau_{off}} \qquad \text{Eq. 7}$$

$$\tau_{on} = \frac{1}{k_{off}} \text{ et } \tau_{off} = \frac{1}{k_{on}} \qquad \text{Eq. 8}$$

Le rapport entre le taux d'ATPase et k_{off} définit le 'rapport de charge' r ('duty ratio' en anglais), et correspond à la fraction du temps de cycle pour lequel la myosine reste accrochée à l'actine (Eq. 9).

$$r = \frac{\tau_{on}}{\tau_{on} + \tau_{off}} = \frac{k_{ATP}}{k_{off}} \qquad \text{Eq. 9}$$

Lorsque $r \approx 1$, la tête de la myosine passe la majeure partie de son cycle d'ATPase dans un état lié à l'actine. Le moteur est dit processif, car un tel moteur, lorsqu'il est constitué d'un dimère, est capable de réaliser un grand nombre de cycles d'ATPase avant de se décrocher (il est improbable que les deux têtes soient décrochées en même temps). Les myosines V (r>70% ; De La Cruz et al. 1999) et VI (r>50% ; De La Cruz et al. 2001) fournissent deux exemples de moteurs processifs. Dans le cas contraire ($r \ll 1$), la tête de la myosine passe la majeure partie de son temps dans un état décroché et le moteur est dit non processif. La myosine II, comme beaucoup d'autres myosines, est non processive, avec un rapport de charge de 2,5% (Veigel et al. 2003). Pour que ce type de moteur reste en contact prolongé avec l'actine, il faut nécessairement qu'il opère en groupe ; c'est le cas des myosines II musculaires qui, comme nous l'avons dit précédemment, s'auto-assemblent en filaments épais bipolaires de plusieurs centaines de molécules. C'est la nature de l'étape limitante du cycle d'ATPase qui contrôle la processivité du moteur. Pour les moteurs processifs, il s'agit de la libération de la molécule d'ADP, alors que pour les moteurs non processifs, c'est l'accrochage de la myosine et la libération de la molécule de phosphate qui constituent l'étape limitante (De La Cruz et al. 2004) (Figure 22).

4. Couplage mécano-biochimique

Dans le modèle de 'coup de force' ('power stroke' en anglais), l'activité motrice de la myosine résulte d'un couplage fort entre les états chimiques et conformationnels de la myosine (Figure 23). Revenons au cycle d'ATPase (voir page 33) en partant à nouveau de l'état *rigor mortis* (état A.M). Après fixation d'une molécule d'ATP (état A.M.ATP), la myosine est en faible interaction avec le filament et s'en décroche (état M.ATP). La myosine hydrolyse alors la molécule d'ATP (état M.ADP.P_i). Cette étape provoque un changement conformationnel 'armant' la myosine pour la génération de forces ultérieures. La myosine se raccroche ensuite au filament d'actine (état A.M.ADP.P_i). Dans cet état, l'affinité de la myosine avec le filament d'actine est basse ; il peut alors y avoir des évènements d'accrochage/décrochage de la myosine sans qu'ils ne soient associés à des changements conformationnels (Batters et al. 2004, Batters et al. 2004, Nagy et al. 2013). La libération du phosphate (P_i) conduit à un état fortement lié à l'actine (état A.M.ADP). Cette libération suivie de celle de l'ADP produit un changement conformationnel qui met, par l'intermédiaire d'un ressort interne, la molécule sous tension : c'est le 'coup de force' (Figure 23.B). Le moteur se retrouve alors dans son état *rigor mortis*.

Il a été montré dans des expériences de molécules uniques que certaines myosines (myosines I, II, V) présentent deux changements de conformation successifs durant un cycle d'ATPase (Rock et al. 2001, Veigel et al. 2002, Veigel et al. 2003). Le

premier se produit quasi-immédiatement après l'accrochage de la myosine et la libération du phosphate. Quant au second, il correspond à la libération de la molécule d'ADP.

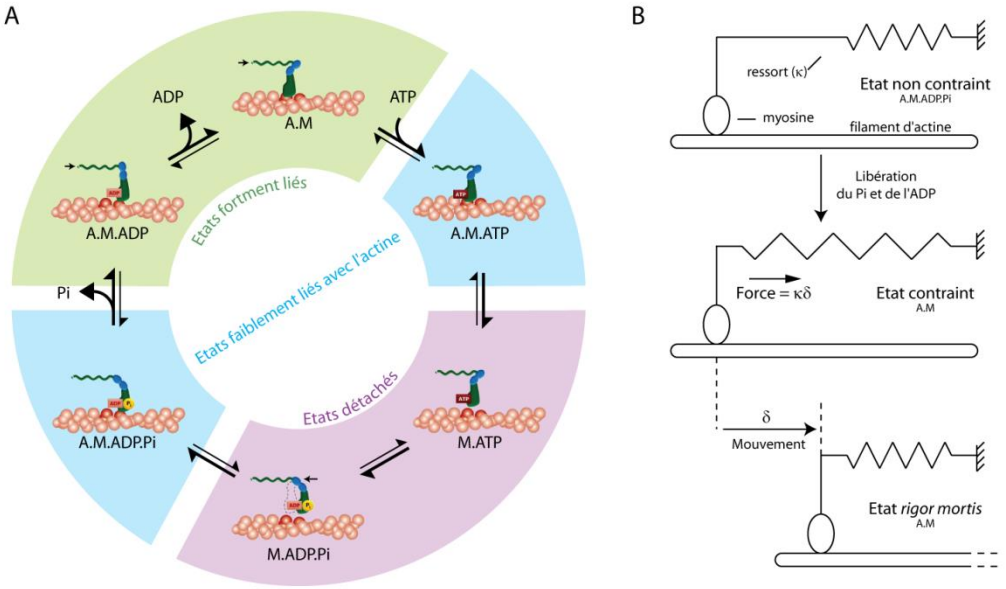


Figure 23 : Modèle du coup de force d'une tête de myosine. A : Cycle mécano-biochimique. Les forces générées sont reliées à l'état biochimique de la myosine lors du cycle d'ATPase ainsi que la force des liens acto-myosine (Adapté de Alberts et al. 2008). B : Mécanisme de production de force. La molécule se met sous tension lorsqu'elle s'accroche à l'actine par le biais d'un changement conformationnel rapide.

5. Pas, vitesse et 'run length'

a. Pas et vitesse

Avec une seule tête, la myosine se décroche à chaque cycle d'hydrolyse à moins, ce qui est très rare, qu'un autre domaine de la molécule interagisse avec l'actine pour maintenir le moteur au contact (mouvement 'ver de terre', Nishikawa et al. 2006). Le moteur simple tête n'a donc généralement pas la capacité de se mouvoir le long d'un filament d'actine, même si le moteur est processif. En revanche dès qu'un système comporte plus de deux têtes, plusieurs cycles consécutifs peuvent donner naissance à un déplacement le long du filament.

Pour un moteur processif ($r \approx 1$, exemple : myosine V et VI), un dimère suffit pour générer un mouvement dirigé (Figure 24, Rief et al. 2000, Okten et al. 2004) tandis que pour un moteur non processif ($r \ll 1$), un nombre suffisant de moteurs est nécessaire, au moins égal à $1/r$, pour que l'assemblée se comporte de manière processive. En effet, une myosine à double tête ne peut rester accrochée que si, lorsque l'une de ses deux têtes procède à l'hydrolyse de la molécule d'ATP, la seconde est liée au filament d'actine. Le déplacement du centre de masse de la myosine (ou du groupe de myosine) conduit à un 'pas' moyen Δ mesuré en divisant la vitesse du mouvement par le taux d'ATPase : $v=\Delta k_{ATP}$. Il est à noter que ce pas est généralement plus grand que le déplacement δ du bout du sous-fragment S1 résultant du changement de con-

formation de la tête (voir page 29 et Figure 25). Il y a à cela plusieurs raisons. Pour un dimère processif (myosine V ou VI), le pas comprend une étape de recherche diffusive du site de liaison suivant sur le filament. Par exemple, lors d'un cycle d'ATPase, une tête de myosine V se déplace de 72 nm alors que le changement de conformation associé est de δ= 25 nm, la recherche diffusive implique ainsi un déplacement de 47nm. Quant au centre de masse, le déplacement est deux fois plus faible que celui de la tête Δ= 36 nm (Figure 25) (Rief et al. 2000, Yildiz et al. 2003, Pierobon et al. 2009). Le pas de la myosine dépend de son identité. Ainsi la myosine VI génère un pas de 30 nm (Rock et al. 2001). Les vitesses attendues sont alors de 360 nm.s^{-1} (Howard 2001) pour la myosine V (k_{ATP}= 10 s^{-1}) et de 250 nm.s^{-1} pour la myosine VI (k_{ATP}= 8,3 s^{-1}).

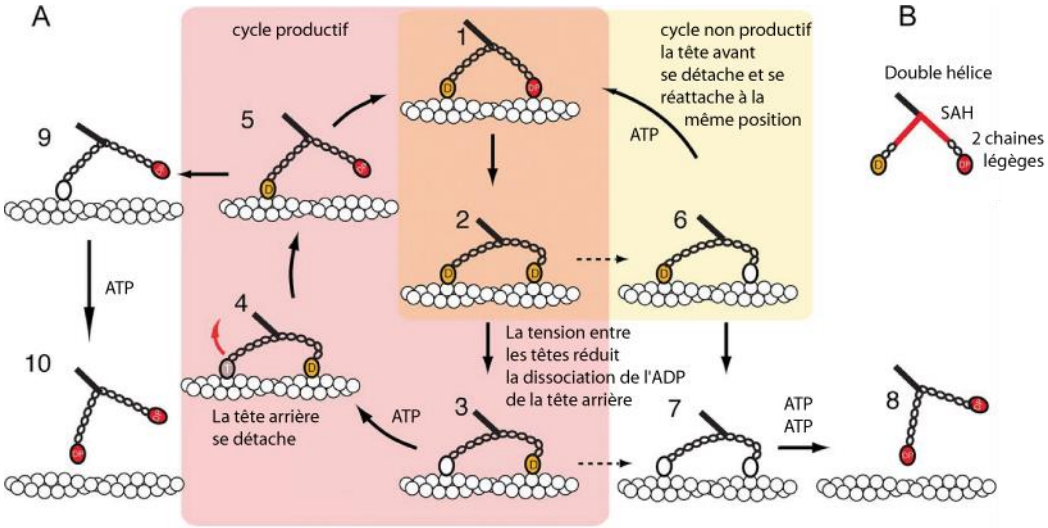


Figure 24 : Couplage mécanochimique pour la myosine V. A : Une myosine à deux têtes suit différents cycles d'hydrolyse de la molécule d'ATP selon l'interaction des têtes avec un filament d'actine. Deux possibilités : soit son changement de conformation conduit à un mouvement du centre de masse, il est alors question de cycle productif ; soit la myosine n'y arrive pas, le cycle est ainsi non-productif. B : La myosine V se compose d'une double hélice définissant le bout de la queue et rattachée au domaine SAH qui change de conformation lors de l'hydrolyse de l'ATP. Deux chaines légères y sont accrochées ; elles régulent notamment les propriétés de la myosine. Au-delà de ce cou se trouve la tête représentée par une ellipse remplie d'une lettre D sur fond orange en présence d'ADP et d'une lette T sur fond rouge lorsqu'elle est associée à l'ATP. (Batchelor et al. 2015)

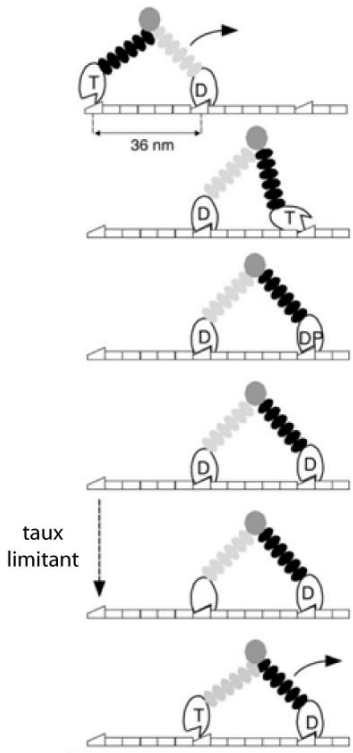


Figure 25 : Modèle de déplacement 'hand over hand' de la myosine V. La myosine, mise sous tension par les étapes précédentes du cycle, se décroche du filament par sa tête arrière (noir) après liaison d'une molécule d'ATP. La tension interne génère alors un mouvement de diffusion biaisé amenant en moyenne cette tête 72 nanomètres en avant. Après hydrolyse de l'ATP, la tête s'accroche au filament. La libération de l'atome de phosphate par la tête avant puis de la molécule d'ADP par la tête arrière (gris) met de nouveau la myosine sous tension. Après un demi-cycle de catalyse de chacune des deux têtes, la myosine a effectué un pas. (Rief et al. 2000)

Dans le cas des moteurs non processifs ($r \ll 1$: myosine II), la distance parcourue par une assemblée de myosines (une molécule unique ne crée généralement pas de mouvement directionnel) par cycle d'hydrolyse –le pas apparent Δ – est beaucoup plus grande que la taille δ du changement conformationnel d'une molécule unique. En effet, dans le temps d'un cycle, il peut y avoir jusqu'à k_{off}/k_{ATP} coups de forces indépendants, ce qui conduit à une vitesse : $v=\Delta k_{ATP}=\delta(k_{off}/k_{ATP})k_{ATP}$, et donc à un 'pas' effectif $\Delta=\delta(k_{off}/k_{ATP})=\delta/r \gg \delta$; la vitesse s'écrit alors $v=\delta k_{off}$. Contrairement aux moteurs processifs ($r \approx 1$), le nombre de moteurs non processifs d'une assemblée influence sa vitesse (voir ci-dessous). A saturation, la myosine II produit une vitesse de 5 $\mu m.s^{-1}$(Veigel et al. 2003) associée à un pas effectif de 200nm.

b. Vitesse *in vitro*

Depuis plus de trente ans, le test de motilité *in vitro* est un outil à la fois simple et robuste pour l'étude directe des mécanismes d'interaction entre moteur et filament d'actine. Cet outil consiste en la création d'une surface de moteurs dont les domaines d'accrochage au filament d'actine (les têtes) pointent vers l'extérieur ; les filaments peuvent alors glisser sous l'action des moteurs (Kron et al. 1986).

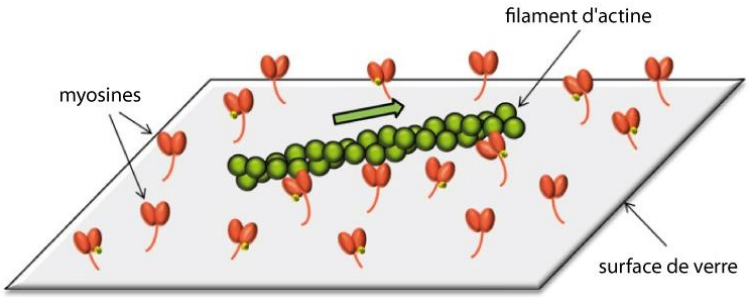


Figure 26 : Illustration du principe d'un essai de motilité *in vitro*. L'action d'un tapis de myosines sur des filaments d'actine produit un mouvement dirigé de ces derniers le long de la surface. (Source : http://lauzonlab.mcgill.ca/Res_team/genevieve.htm)

L'adhésion des moteurs sur la surface peut être faite de façon non spécifique par l'intermédiaire d'un dépôt d'une couche de nitrocellulose sur laquelle les moteurs adhèrent. Dans le cas de petites protéines motrices, il peut être nécessaire d'utiliser des anticorps spécifiques de la queue de myosine pour orienter les moteurs et les éloigner de la surface. Ceci assure que les têtes des moteurs soient libres d'interagir avec les filaments d'actine.

Différents paramètres influencent la vitesse de déplacement des filaments. Tout d'abord, si la concentration d'ATP est trop faible, l'association de l'ATP à la tête du moteur peut devenir l'étape limitante du cycle d'ATPase. La vitesse des filaments est alors ralentie. Dans le cas de la myosine II, la vitesse diminue en-dessous d'une concentration en ATP de 200 µM (Kron et al. 1986). De plus, plus la force ionique est importante, plus les vitesses sont faibles. La motilité des myosines II est bloquée au-delà d'une concentration en chlorure de potassium de 100 mM. C'est également le cas si le pH n'est pas compris entre 6,5 et 9,5.

La vitesse moyenne des filaments ainsi que sa variabilité dépendent de la température. Concernant la myosine II, en dessous de 17,5°C la distribution des vitesses est large et ne présente pas de pic bien défini. Augmenter la température fait émerger, par réduction de la variabilité, un pic dans la distribution des vitesses. La vitesse associée croît de manière significative de 2 à 10 $\mu m.s^{-1}$ entre 20 et 30°C (Bourdieu et al. 1995).

La myosine II étant un moteur non processif, la vitesse du mouvement dépend de la densité des moteurs sur la surface. Pour pouvoir observer ce phénomène, il faut que l'assemblée de moteurs demeure à proximité du filament d'actine pendant le temps où elle demeure décrochée ; un agent de déplétion (la méthylcellylose) permet de jouer cette condition. En dessous de 300 molécules.μm^{-2}, le profil des vitesses est large et ne présente pas de valeur privilégiée. Augmenter cette densité fait émerger, par réduction de la variabilité, un pic. A température ambiante (20-25°C), la vitesse associée croît vers une limite comprise entre 2 et 5 $\mu m.s^{-1}$. La saturation est atteinte pour une densité de surface de 450 molécules.μm^{-2} (Bourdieu et al. 1995), ce qui correspond à une distance moyenne entre moteurs d'environ 50 nm.

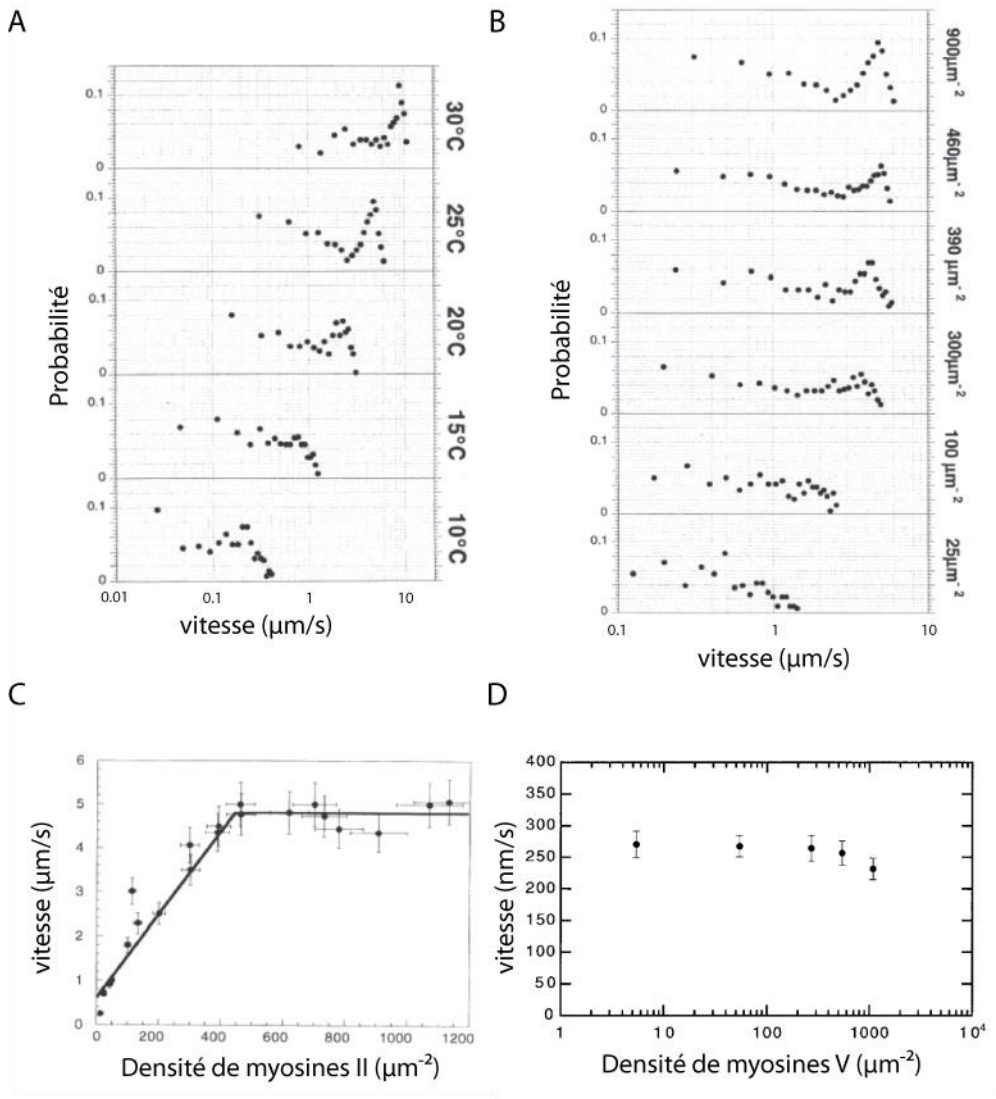


Figure 27 : Distribution des vitesses lors d'un essai de motilité in vitro. A : Distribution de la vitesse des filaments interagissant avec des myosines II à différentes températures (Densité 900 molécules.µm^{-2}). B : Distribution de la vitesse des filaments interagissant avec des myosines II à différentes densités de moteurs sur la surface (T 25°C). C : Vitesse moyenne des filaments d'actine en fonction de la densité surfacique de myosines II (moteurs non processifs) (T 25°C). La méthycellulose a été ajoutée au bain pour maintenir le filament à la surface. D : Vitesse des filaments d'actine en fonction de la densité surfacique de myosines V (moteurs processifs). (A,B,C : Bourdieu et al. 1995 ; D : Rock et al. 2000))

c. Distance de parcours ('run length')

Lorsqu'un moteur, ou un groupe de moteurs, se déplace le long d'un filament d'actine, il vient un moment où il s'en détache. La distance parcourue pendant ce laps de temps est appelée distance de parcours ('run length'). Les molécules uniques de myosines V et VI (dimères) ont des longueurs de parcours respectivement de l'ordre du micron et du demi-micron (Mehta et al. 1999, Sakamoto et al. 2003, Baker et al. 2004, Brawley et al. 2009, Zimmermann et al. 2015). La distance de parcours peut dépendre du type de nucléotide associé à l'actine (Zimmermann et al. 2015), de la concentration en ADP présente en solution (Baker et al. 2004) ou de la structure du réseau de filaments d'actine (Brawley et al. 2009).

Cette distance évolue en fonction du nombre de moteurs impliqués. Dans le cas de la myosine V, une assemblée de moteurs (~10 moteurs) présente une distance de parcours cinq fois plus grande que la molécule unique (Sivaramakrishnan et al. 2009).

6. Mécano-sensibilité

a. Effet d'une force extérieure sur le taux d'ATPase

Le muscle dégage plus de chaleur lorsqu'il se contracte (la longueur du muscle diminue) que lorsqu'il maintient une tension (condition isométrique = la longueur du muscle est constante). Cette chaleur correspond en partie à l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP. La différence d'énergie entre les deux états du muscle met en évidence le ralentissement du cycle d'ATPase lorsque le muscle est sous tension. Ce phénomène est appelé 'effet Fenn', du nom de la personne qui l'a décrit (Fenn 1923). La mécano-sensibilité de la myosine fournit une explication simple à cet effet (Duke 1999).

Un système moléculaire est mécanosensible s'il peut exister sous deux états conformationnels différents dont l'équilibre ('balance détaillée') peut être perturbé par l'application d'une force extérieure (Howard 2001). Ainsi, si le changement conformationnel d'un moteur dû à l'hydrolyse de l'ATP se produit dans un état rigidement lié à son substrat (ici l'actine), l'application d'une force extérieure dans l'axe du mouvement du moteur permet d'accélérer ou de ralentir sa progression le long du filament d'actine (Figure 28).

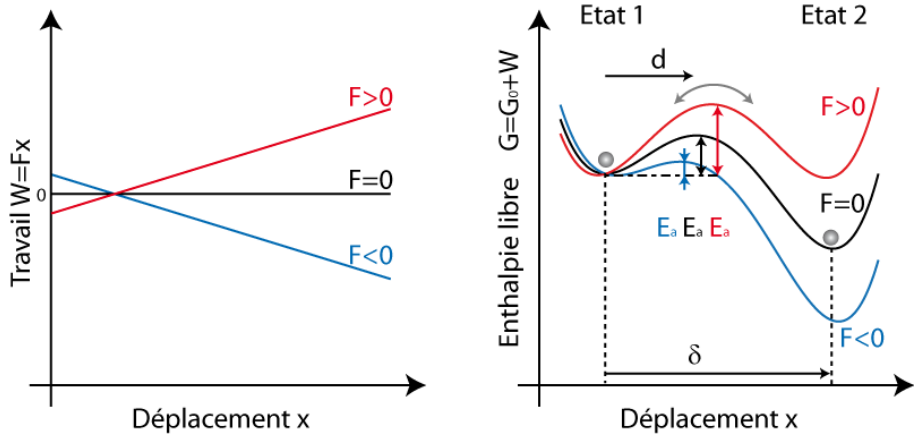


Figure 28 : Mécano-sensibilité d'une isomérisation entre 2 états. Représentation schématique d'un diagramme d'enthalpie libre montrant la barrière d'énergie positionnée entre deux puits potentiels séparés d'une distance δ pour différentes forces extérieures appliquées (rouge positive, noir nulle, bleue négative). Ici, chaque puits représente un état de conformation (état 1 et état 2) et l'axe horizontal correspond à la composante de déplacement du système le long du filament d'actine. De l'état 1 à l'état 2, la barrière d'énergie E_a est franchie après un déplacement d du système. Une force positive (trace rouge) augmente la barrière d'énergie et ralentit donc la transition ; une force négative (trace bleue) l'accélère.

La cinétique pour franchir une barrière énergétique E_a peut être décrite par la loi d'Arrhenius (ou la théorie de Kramers) (Eq. 10). L'application d'une force F

change la hauteur de la barrière d'énergie à franchir (Figure 28). Nous considérerons comme positive une force opposée au sens de déplacement naturel du moteur. En présence d'une force extérieure, l'enthalpie libre G du système est modifiée par le travail de la force W=-Fx. Une force positive a pour effet d'augmenter la barrière d'énergie à franchir. Cette barrière est dépassée lorsque le système atteint un déplacement caractéristique d. Ainsi le travail fourni pour la réaction est -Fd (Eq. 10).

$$k = k_0\, e^{-\frac{E_a}{k_B T}} = \bar{k}_0 e^{-\frac{Fd}{k_B T}} \qquad \text{Eq. 10}$$

Plus la distance d est grande, plus la cinétique de la réaction est sensible à la force. Il est possible de définir une force caractéristique à partir de la distance d : $F_c = k_B T/d$. Tant que les forces mises en jeu sont inférieures à cette force caractéristique, la variation des taux de transition est faible.

Certaines myosines, comme les myosines V, VI, et Ib ont démontré leur mécano-sensibilité dans des expériences de molécules uniques (Veigel et al. 2003, Altman et al. 2004, Clemen et al. 2005, Laakso et al. 2009). La myosine étant fortement liée au filament d'actine seulement lors de la libération de la molécule d'ADP, cette étape correspond généralement à la partie 'force dépendante' du taux d'hydrolyse de la myosine. Le ralentissement de cette étape augmente le rapport de charge : la myosine reste plus longtemps accrochée au filament. Ce phénomène correspond à un effet d'ancrage ('Catch bond effect') et permet de diminuer la consommation d'ATP dans des conditions de maintien de tension d'un système (effet 'Fenn').

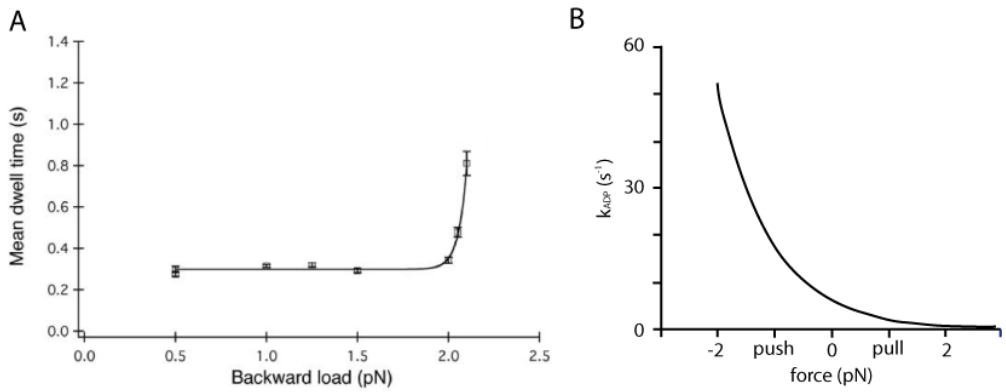


Figure 29 : Mécano-sensibilité des myosines VI et V. A : durée d'accroche de la myosine VI à l'actine en fonction de la force extérieure à 2 mM d'ATP. La mécano-sensibilité n'apparaît qu'au-delà d'un seuil (Altman et al. 2004). B : cinétique de dissociation de la molécule d'ADP par la myosine V sur un filament d'actine selon la force (Adapté de Veigel et al. 2005).

Un exemple spectaculaire de mécano-sensibilité est fourni par la myosine 1b, dont le taux de charge augmente à plus de 90% en présence d'une force de 2 pN ce qui correspond à une constante cinétique de décrochage 75 fois plus faible qu'en l'absence de force (Laakso et al. 2009). La myosine II du muscle squelettique est faiblement mécano-sensible (Veigel et al. 2003). Cependant, cette propriété permet aux myosines dans le muscle de passer d'un taux de charge de 4% à 14% (Fenn 1923). La myosine VI a un comportement non linéaire. Pour de faibles forces, l'étape mécano-

sensible n'est pas prépondérante et la durée moyenne passée dans l'état accroché dépend très peu de la force. Néanmoins, cette étape devient dominante pour les forces supérieures à 2 pN et la myosine VI présente alors un fort effet d'ancrage (Figure 29.A, Altman et al. 2004). Pour la myosine V à simple tête, la libération de l'ADP limite le cycle d'ATPase et dépend faiblement de la force (d≈4,3 nm) (Figure 29.B, Veigel et al. 2005).

b. Relation force-vitesse

Lorsqu'une force extérieure s'oppose au coup de force d'une myosine unique (une tête), le moteur peut soit se décrocher sans finir son cycle, soit le terminer mais dans un laps de temps plus grand (effet d'ancrage décrit dans le paragraphe précédent). Sous tension, la vitesse de déplacement de moteurs processifs (ou d'une assemblée de moteurs non processifs) peut alors diminuer. La relation entre la force et la vitesse a été mesurée pour la kinésine, un moteur processif qui interagit avec les microtubules ; la relation force-vitesse est presque linéaire (Figure 30, Svoboda et al. 1994).

La force extérieure qui arrête le mouvement d'un moteur est nommée 'force d'arrêt' ('stall force' en anglais) ; elle est égale et opposée à la force que produit la myosine. Pour les myosines V et VI, les forces d'arrêts sont respectivement à 3 pN (Mehta et al. 1999, Uemura et al. 2004) et 2 pN (Altman et al. 2004). Pour les moteurs non processifs, la force d'arrêt est estimée à partir d'un groupe de moteurs. Pour la myosine II, cette force a été estimée entre 2 et 9 pN (Ishijima et al. 1993, Finer et al. 1994, Molloy et al. 1995, Takagi et al. 2006).

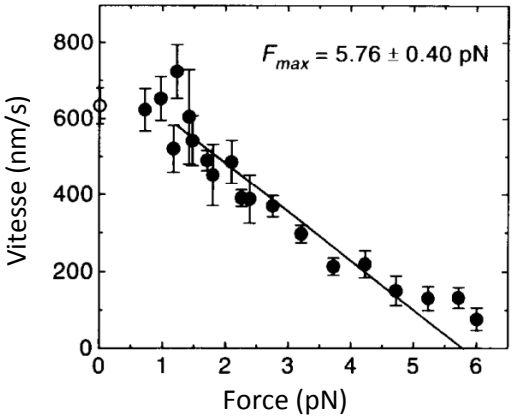


Figure 30 : Relation force-vitesse de la kinésine. F_{max} correspond à la force d'arrêt du moteur (Svoboda et al. 1994).

Au-delà de la force d'arrêt, un moteur processif (ou une assemblée de moteurs non processifs) peut, soit rester accroché au filament (effet 'catch bond' fort), soit se détacher (détachement de toutes les têtes), soit montrer une vitesse opposée à son sens naturel de déplacement et effectuer alors des pas en arrière ('backward step') liés à un phénomène d'accrochage et de décrochage successifs des têtes du moteur (Gebhardt et al. 2006).

c. Effet d'une force extérieure sur la distance de parcours et la durée de la trajectoire d'un moteur

La distance de parcours ('run length') d'un moteur processif mécanosensible peut dépendre de la force extérieure. La kinésine, par exemple, a une distance de parcours qui diminue lorsque la force s'opposant à son mouvement augmente (Figure 31). En prenant en compte la relation force-vitesse du moteur (Figure 30), il a alors été observé que la durée moyenne de la trajectoire diminue exponentiellement avec la force appliquée. L'inverse de cette durée moyenne définit un taux de dissociation du moteur, noté $k_{off,T}$, qui vérifie :

$$k_{off,T}(F) = k_{off,T}(0)\exp(+F/F_c) \qquad \text{Eq. 11}$$

où la force caractéristique F_c= 3,3 pN représente l'amplitude de la force extérieure F qu'il faut appliquer pour augmenter le taux de dissociation d'un facteur exp(1)≅2,7. Il est à noter que cette forme de mécano-sensibilité n'est pas en contradiction avec la mécano-sensibilité du taux d'ATPase que nous avons décrite précédemment (page 40 ; Eq. 10). Le taux d'ATPase peut ralentir sous l'effet de la force, et donc le temps entre deux pas du moteur s'allonger, tout en raccourcissant la durée de la trajectoire : il suffit pour cela que le nombre de pas successifs effectués par le moteur, avant qu'il ne se dissocie du filament, diminue suffisamment.

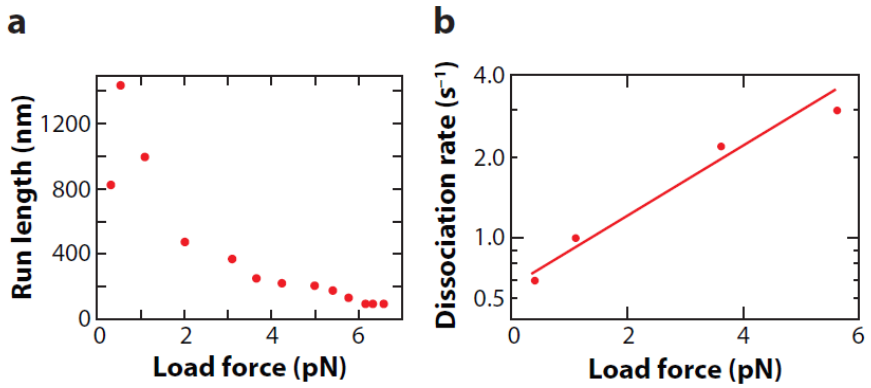


Figure 31 : Variation de la distance de parcours (a) et du taux de dissociation (b) de la kinésine en fonction de la force extérieure (Schnitzer et al. 2000, Howard 2009).

Les propriétés d'une tête de myosine ne s'extrapolent pas obligatoirement au dimère. Dans le cas de la myosine V, la seconde tête absorbe la contrainte durant l'étape mécano-sensible de la première. Cette répartition des forces entre les deux têtes diminue ainsi la mécano-sensibilité du dimère : la distance de parcours de la myosine V est insensible à la force extérieure (Clemen et al. 2005). Cependant, la vitesse de la myosine diminue pour des forces s'opposant au mouvement naturel du moteur. Ainsi, le nombre de pas Δ effectués par la myosine est constant, mais se fait dans un laps de temps plus grand lors de l'application d'une force extérieure positive (Figure 32, Clemen et al. 2005).

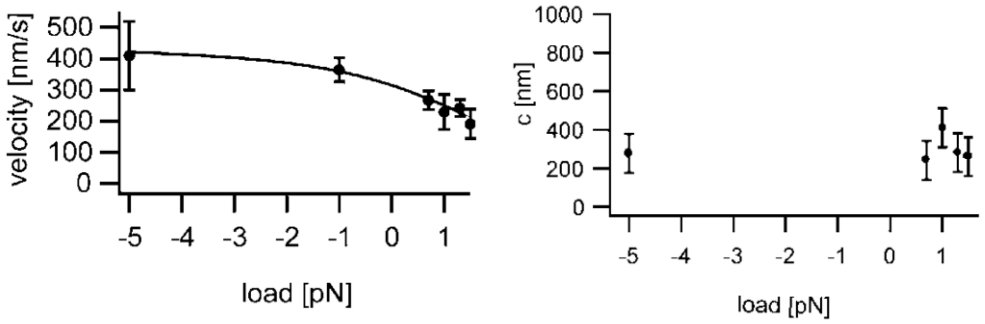


Figure 32 : Variation de la vitesse (à gauche) **et de la distance de parcours** (à droite) **de la myosine V à deux têtes selon la force extérieure** (Clemen et al. 2005).

7. Propriétés émergentes d'un groupe de myosines évoluant dans un réseau de filaments d'actine : effets collectifs

   a. Oscillations spontanées par une assemblée de moteurs

Les moteurs moléculaires opèrent généralement en groupe, ce qui peut conduire à des propriétés émergentes qui ne sont pas facilement déduites du comportement d'un moteur individuel (revue : Guerin et al. 2010). L'apparition d'oscillations spontanées en fournit l'exemple le plus frappant.

Il existe de nombreux systèmes oscillants à base de moteurs moléculaires. Les muscles responsables du battement des ailes de certains insectes vibrent *in vivo* à un rythme asynchrone par rapport aux impulsions nerveuses qui activent la contraction musculaire (Pringle 1978). Les fibres du muscle cardiaque sont également capables d'osciller spontanément *in vitro*, en l'absence de toute oscillation électrique ou chimique qui pourrait entraîner l'oscillation mécanique du muscle (Fabiato et al. 1978). Même les fibres du muscle squelettique, qui pourtant n'ont pas pour fonction d'osciller spontanément, peuvent le faire dans des conditions (non physiologiques) d'activation partielle (Ishiwata et al. 2007). Il existe également des oscillateurs dans des systèmes non musculaires. Les oscillations spontanées de la touffe ciliaire des cellules mécano-sensorielles ciliées de l'oreille interne (Martin et al. 2003), du faisceau mitotique durant la division cellulaire asymétrique (Pecreaux et al. 2006), ou encore le battement des flagelles du spermatozoïde (Machin 1958, Brokaw et al. 1982, Riedel-Kruse et al. 2007, Alberts et al. 2008) en fournissent divers exemples. Alors que les oscillations des systèmes musculaires et des cellules ciliées reposent sur l'activité du système acto-myosine, les oscillations du faisceau mitotique, des cils, et des flagelles reposent eux sur l'activité des moteurs dynéines en interaction avec des microtubules. Tous ces systèmes ont néanmoins en commun la propriété de renfermer une assemblée de moteurs moléculaires mise sous contrainte élastique par leur environnement mécanique.

Pour expliquer l'ensemble de ces comportements, il a été proposé, dans une approche théorique très générale, qu'une instabilité oscillatoire puisse émerger d'un effet générique collectif lorsqu'une assemblée de moteurs est sous contrainte élastique (Julicher et al. 1997). Une approche biomimétique *in vitro* avec un système acto-myosine minimal a apporté du crédit à cette hypothèse. En effet, il a été observé que

lorsque une pince optique est utilisée pour amener un filament d'actine unique au contact d'un tapis de myosines (myosine II HMM du muscle squelettique de lapin), la bille qui a été accrochée au filament et qui sert de poignée se met à osciller spontanément (Figure 33.A-B, Placais et al. 2009). Récemment, dans une autre approche *in vitro* utilisant un nombre minimal de protéines, il a été observé que des microtubules, en présence de clusters de kinésines et d'un agent de déplétion (polyethylène glycol), peuvent s'auto-organiser en flagelles oscillants à l'interface entre la solution et des bulles d'air (Figure 33.C-D, Sanchez et al. 2011).

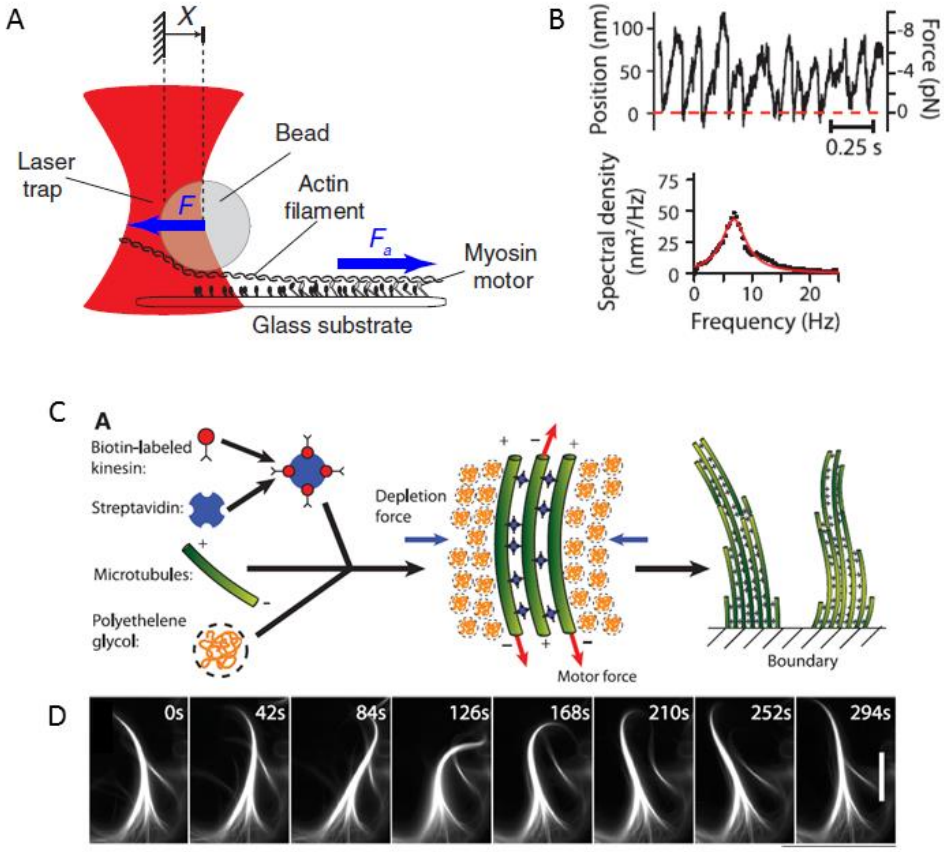


Figure 33 : Oscillations spontanées avec des groupes de moteurs sous contrainte élastique dans des systèmes biomimétiques minimaux. A : dispositif de pinces optiques dans lequel un filament d'actine couplé à une bille (diamètre 1 µm) est amené au contact d'une assemblée de myosines. L'état stationnaire résulte d'un équilibre entre la force active F_a développée par l'assemblée de moteurs et la force de rappel élastique F développée par la pince. Cet équilibre est ici instable ; le système oscille spontanément. B : oscillations spontanées du système acto-myosine illustré en A. L'oscillation consiste en un mouvement lent dans la direction naturelle du mouvement des moteurs, qui met l'actine sous tension, suivit d'un mouvement rapide dans la direction opposée lié au décrochage collectif des moteurs du filament d'actine (haut). Le spectre du mouvement révèle un pic : le système oscilla à 8Hz. C : représentation schématique de l'auto-assemblage de microtubules et de clusters de kinésines en flagelles oscillants en présence d'un agent de déplétion (PEG). D : Séquence d'images d'un flagelle démontrant un battement périodique (en ~300s). Données A-B adaptées de Placais et al. 2009 ; C-D adaptées de Sanchez et al. 2011.

Pour qu'un système mécanique présente une instabilité oscillatoire, il est nécessaire qu'il soit capable de compenser les forces de friction qui s'opposent au mouvement du système. Cela n'est possible que pour un système actif. L'ingrédient physique fondamental commun à tous les modèles cherchant à décrire une oscillation spontanée

est donc la 'friction négative' qui doit émerger de l'activité du système moteur (Julicher et al. 1997, Riedel-Kruse et al. 2007, Howard 2009, Placais et al. 2009, Guerin et al. 2010, Muller et al. 2010). Un moyen simple d'arriver à une condition de friction négative est que le taux de dissociation ($k_{off,T}$) du moteur individuel soit accéléré par la force qui lui est appliquée, dans le cas où celle-ci s'oppose au mouvement du moteur (Eq. 11). Nous avons vu que la kinésine présente ce type de mécano-sensibilité (Figure 31.b). Dans ce cas, une assemblée de moteurs peut se décrocher collectivement sous l'action d'une force extérieure F par effet d'avalanche. En effet, s'il y a N moteurs dans le groupe, la force ressentie par un moteur individuel est F/N. Si un moteur se décroche, la force ressentie par les N−1 moteurs restants augmente, ce qui augmente la probabilité de dissociation des moteurs, et favorise une dissociation abrupte de toute l'assemblée de moteurs. Ce comportement permet d'interpréter qualitativement la phase rapide de l'oscillation observée *in vitro* avec la myosine II HMM (Figure 33.B), même s'il s'agit d'un système très différent du système kinésine-microtubule. La relation N(F) entre le nombre de moteurs accrochés et la force extérieure est alors non-linéaire. Par conséquent, même si un moteur individuel est doté d'une relation force-vitesse 'régulière', pour laquelle le moteur ralentit quand une force s'oppose à son mouvement naturel et accélère quand une force le favorise (voir l'exemple de la kinésine Figure 30), la relation force-vitesse d'un groupe de moteurs peut présenter une zone de pente négative correspondant à la production de friction négative par le système moteur (Figure 34). Si le système est couplé à un élément élastique et que la force d'arrêt se trouve dans la zone de pente négative de la relation force-vitesse, le système oscille spontanément (Guerin et al. 2010).

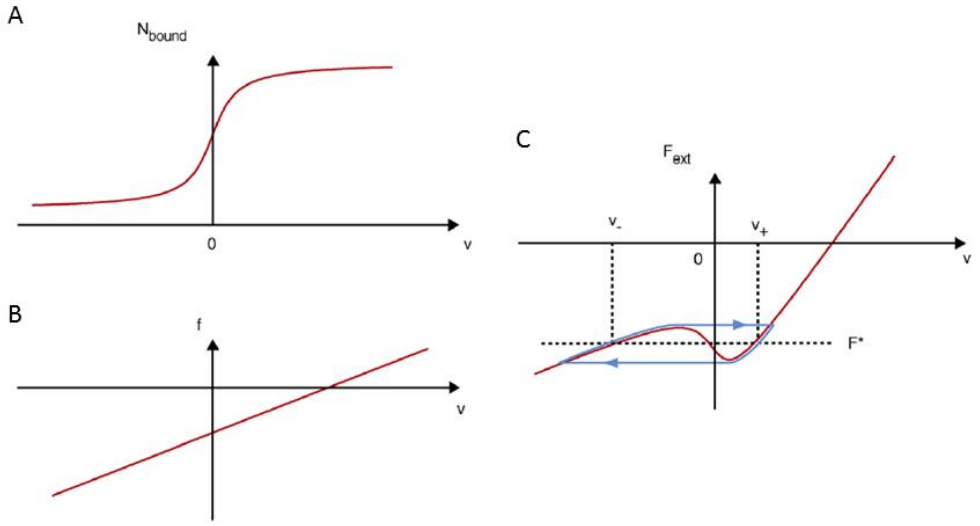


Figure 34 : Friction négative par une assemblée de moteurs avec un taux de dissociation dépendant de la force. A : Si le taux de dissociation augmente avec la force, le nombre de moteurs accrochés dépend de la vitesse de mouvement. Un mouvement dans la direction négative ($v<0$) met les moteurs sous tension, ce qui favorise leur dissociation. B : relation force-vitesse pour un moteur individuel. Une force f négative s'oppose au mouvement naturel du moteur et le ralentit, alors qu'une force positive l'accélère. C : Force extérieure $F_{ext}=N_{bound}\times f$ en fonction de la vitesse v pour l'assemblée de moteurs ; c'est le produit des courbes tracées en A et B. La relation force-vitesse présente une zone de pente négative, correspondant à la production de friction négative par le système moteur. Sous l'effet d'une force de rappel élastique, la condition d'arrêt ($v= 0$) est instable et le système oscille (trajectoire en bleu). Schémas tirés de Guerin et al. 2010.

b. Influence de l'architecture du cytosquelette sur les propriétés du transport intracellulaire

La cellule eucaryote génère un ordre interne essentiel à son bon fonctionnement. Cet ordre résulte d'une compartimentation des fonctions dans la cellule, notamment à travers un cytosquelette dont l'organisation varie d'une zone à une autre. La cellule a la capacité de recruter localement des moteurs ou de les exclure en fonction de la structure du réseau de filaments (Dance et al. 2004, Brawley et al. 2009). Par exemple, les myosines V et X sont inhibées dans les fibres de stress (elles sont là mais ne bougent pas), contrairement à la myosine VI. De même, il existe un recrutement de la myosine X dans les filopodes tandis que la myosine VI en est exclue. Les différentes myosines présentent également différentes vitesses de déplacement et de distance de parcours selon leurs localisations dans la cellule. La structure du réseau de filaments d'actine est ainsi un paramètre de contrôle du transport intracellulaire.

Evidemment, comme nous l'avons décrit précédemment (voir page 21), un réseau parallèle favorise le transport dirigé. Par exemple, lors de la formation des filopodes constitués de filaments d'actine parallèles, la myosine X transporte efficacement les protéines nécessaires au bout de ces villosités (Watanabe et al. 2010, Kerber et al. 2011). Les réseaux de filaments d'actine désordonnés constituent un niveau de complexité supérieure auquel doit s'adapter la cellule pour que le transport intracellulaire reste efficace. Le lamellipode fournit un exemple de réseau désordonné avec un 'ordre nématique' : il existe une direction moyenne des filaments suivant l'axe joignant la périphérie de la cellule au noyau. Il a été démontré que la rigidité du bras de levier (cou) d'une myosine influence la directionnalité des trajectoires d'un petit groupe de moteurs transportant un cargo dans un tel réseau (Sivaramakrishnan et al. 2009, Hariadi et al. 2014). Il s'agit d'un effet collectif. Des molécules uniques de myosine V ou VI sont capables de transporter un cargo dans le lamellipode d'un keratotocyte avec une trajectoire dirigée mais bruitée. Les sens du mouvement sont opposés, mais la variance autour de la direction moyenne de déplacement (moyenne sur un ensemble de trajectoires) ne dépend pas du type de myosine utilisé (Figure 35A). Par contre, si le cargo est transporté par un petit groupe de moteurs (6 moteurs sur le cargo), la trajectoire du cargo devient plus régulière (variance plus faible) dans le cas de la myosine VI, mais pas dans le cas de la myosine V (Figure 35B). Cet effet peut être inversé si le cou flexible de la myosine VI est échangé avec le cou rigide de la myosine V et vice versa (Figure 35C). Cette observation spectaculaire indique que plus le cou de la myosine est flexible, plus le groupe de moteurs sera capable de suivre l'orientation moyenne des filaments d'actine composant le réseau du lamellipode, sans se laisser (trop) affecter par le désordre local d'orientation des filaments.

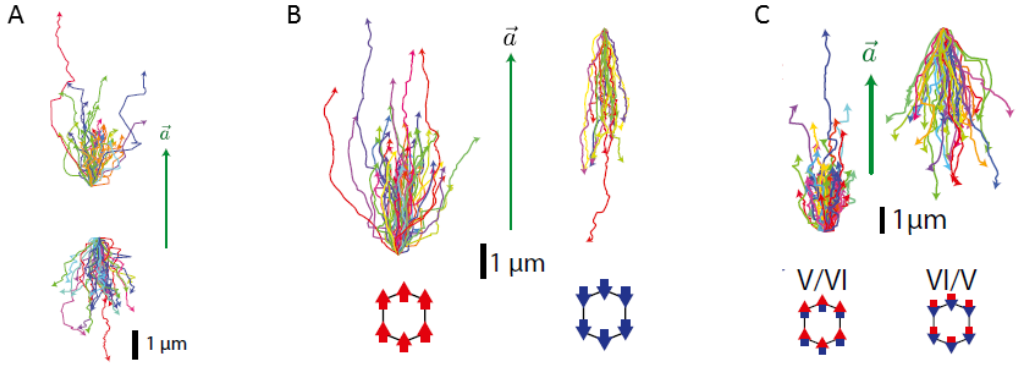


Figure 35 : Trajectoires de myosines V et myosines VI dans le réseau d'actine du lamellipode du kératocyte (Hariadi et al. 2014). A : molécule unique de myosine V (haut) et de myosine VI (bas). B : trajectoires d'un groupe de 6 moteurs de myosine V (gauche) ou de myosine VI (droite) quand les moteurs sont rigidement couplés par un même cargo (origami d'ADN). C : comme en B, mais la myosine V a été modifiée pour remplacer son bras de levier par celui de la myosine VI, et vice versa. La myosine V a un mouvement dirigé vers le haut de la figure, alors que la myosine VI a un mouvement dirigé dans la direction opposée, vers le bas de la figure.

Le réseau antiparallèle constitue un cas extrême où le transport d'un cargo le long de filaments d'une polarité donnée est contraint par une interaction avec des filaments de polarités opposés. Cette géométrie se retrouve dans les fibres de stress contractiles, mais aussi avec le réseau de microtubules du faisceau mitotique. Dans ce dernier cas, il a été montré que le transport actif d'endosomes par la kinésine vers la zone médiane du faisceau, permet de distribuer les cargos entre les deux cellules filles d'une cellule en division et ainsi d'influencer leur destinée au cours du développement (Derivery et al. 2015). La géométrie antiparallèle du réseau de filaments, ainsi que l'équilibre (ou le déséquilibre) entre les densités de filaments de chaque polarité, jouent un rôle essentiel dans le positionnement des cargos dans la zone de recouvrement.

Ces quelques exemples démontrent qu'il existe une influence réciproque entre la structure du cytosquelette et les propriétés, individuelles et collectives, des moteurs moléculaires. Bien que cette influence réciproque soit déterminante dans le processus complexe qui règle les propriétés du transport intracellulaire, elle est encore mal comprise. Des progrès technologiques récents permettent d'aborder cette question fondamentale. Ainsi, le développement d'origami d'ADN permet de contrôler le nombre et la nature des moteurs moléculaires déplaçant le cargo (Hariadi et al. 2014), et donc de mieux contrôler l'aspect moteur du processus de transport. D'autre part, nous avons vu (Section A4, page 23) qu'il est désormais possible de développer *in vitro* des architectures contrôlées d'actine avec un nombre minimal de protéines purifiées. Cette thèse s'inscrit dans ce type d'approche.

8. Tableau récapitulatif des propriétés individuelles des myosines II, V et VI

Type de myosine	II	V	VI
Taux d'ATPase k_{ATP}	25 s^{-1} (1)	10 s^{-1} (2)	8,3 s^{-1} (3)
Taux de décrochage k_{off}	1000 s^{-1} (1)		
Rapport de charge $r=k_{ATP}/k_{off}$	2,5% (4)	>70% (5)	>50% (6)
Etape limitante E_{lim}	Accrochage de la myosine-ATP à l'actine	Libération du phosphate	Libération du phosphate
Taux de E_{lim}	30 s^{-1} (1)	16 s^{-1} (5)	6,4 s^{-1} (6)
Vitesse dans un test de motilité	5 µm.s^{-1} (7)	360 nm.s^{-1} (1)	250 nm.s^{-1} (8)
Power stroke δ	5 nm (9)	25 nm (10)	30 nm (8)
Distance caractéristique de Mécano-sensibilité d $k_{ATP}=k_0 \exp(-Fd/k_BT)$	≈ 0 nm (11)	F>0 pN d= 3 nm (12)	F>2 pN d= 91 nm (13)
Force caractéristique $F_c = k_BT/d$	≪ pN	1,4 pN	2 pN
Distance parcourue par le centre de masse (pas Δ) sur un cycle d'hydrolyse	200 nm (14)	36 nm (15)	30 nm (16)
Distance parcourue avant détachement (processivité)		1 µm (15)	0,5 µm (16)

Tab. 2 : Récapitulatif, non exhaustif, des propriétés des myosines II, V et VI.

(1)	Howard 2001	(9)	Molloy et al. 1995
(2)	Rief et al. 2000	(10)	Veigel et al. 2002
(3)	De La Cruz et al. 2009	(11)	Veigel et al. 2003
(4)	Veigel et al. 2003	(12)	Clemen et al. 2005
(5)	De La Cruz et al. 1999	(13)	Altman et al. 2004
(6)	De La Cruz et al. 2001	(14)	Voir page 35
(7)	Bourdieu et al. 1995	(15)	Rief et al. 2000
(8)	Morris et al. 2003	(16)	Rock et al. 2001

Tab. 3 : tableau des références du tableau Tab. 2.

Chapitre II

Techniques et méthodes expérimentales

Le développement expérimental est une part importante de la recherche à laquelle nous nous sommes intéressés. Il a fallu tout d'abord apprendre à manipuler des protéines et à maîtriser plusieurs techniques de biochimie pour fabriquer *in vitro* des réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée, et des billes fonctionnalisées par des moteurs moléculaires de type myosine. D'autre part, nous avons réalisé des expériences de microscopie de fluorescence. Ces expériences ont donné lieu à un important effort d'analyse d'images et de traitement de données pour détecter la position de billes ou de structures auto-organisées d'actine ('flagelles') afin de suivre leurs dynamiques. Ces différents aspects expérimentaux vont être détaillés dans ce chapitre.

A Fabrication de réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée *in vitro*

Dans cette partie, nous décrirons les différentes étapes de construction des réseaux de filaments d'actine d'architecture contrôlée *in vitro*. Le protocole global est détaillé en annexe (voir page 177).

1. Motifs de nucléation

Les motifs de nucléation sont créés sur une lamelle de verre de 22x22 mm^2 (Figure 37). Tout d'abord, le verre est lavé à l'eau puis à l'éthanol. Après un essuyage à l'aide d'un papier (Kimwipe®), la lamelle est replongée dans de l'eau pour ensuite être séchée sous un souffle d'azote. Afin de finir le nettoyage et de charger électro-négativement sa surface, la lamelle est mise dans un plasma à oxygène pendant trois minutes.

Puis suit une étape de passivation. La lamelle est posée pendant trente minutes sur une goutte de 120 µL de Poly(l-lysine)-graft-poly(éthylène glycol) (PLL-g-PEG, Référence : PLL20K-G35-PEG2K, Jenkem Technology, Figure 36) dilué à 0,1 mg/ml dans 10 mM d'HEPES à un pH de 7,4. Le PLL-g-PEG est une molécule utilisée couramment pour passiver des surfaces (Elbert et al. 1998, Huang et al. 2000, Lee et al. 2008, Azioune et al. 2009, Lee et al. 2009, Lee et al. 2009, Schlapak et al. 2009). La partie PLL adhère électrostatiquement à une surface chargée négativement et plongée dans une solution neutre. Le côté PEG sert d'agent passivant. Après incubation, 300 µL d'eau sont injectés sous la lamelle afin de la rincer. Les lamelles passivées peuvent se garder jusqu'à deux semaines au réfrigérateur. Il est à noter qu'il est aussi possible d'utiliser une passivation avec du silane-PEG.

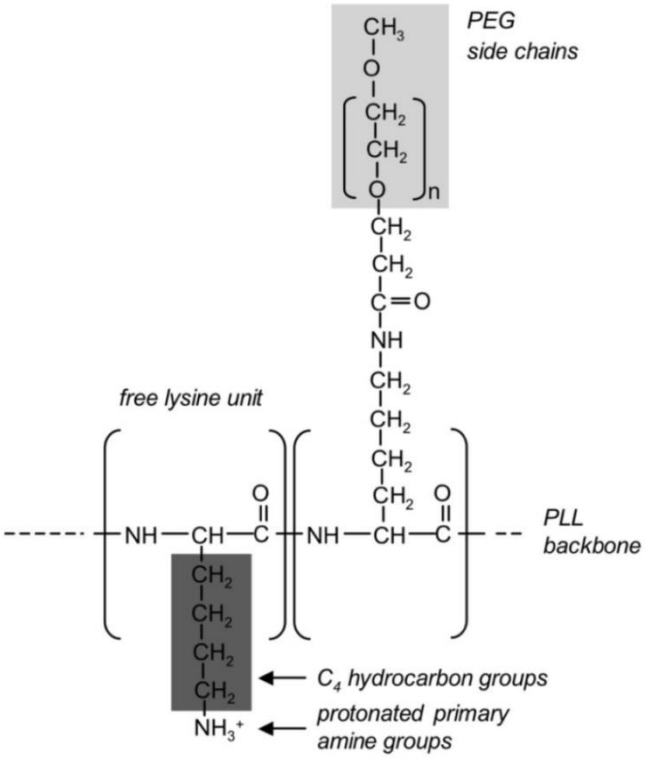


Figure 36 : Structure du Poly(l-lysine)-graft-poly(éthylène glycol)

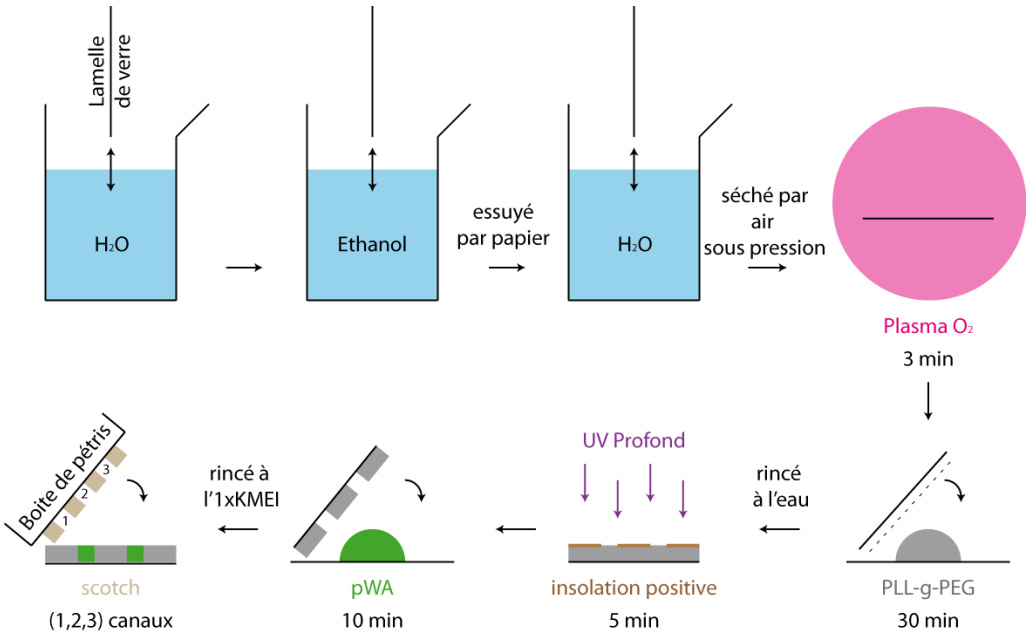


Figure 37 : Illustration du protocole de réalisation de motifs de pWA.

Le taux d'attachement d'une protéine à une surface ainsi passivée est très faible. Pour générer des zones d'adhésion de géométrie contrôlée, la lamelle est exposée pendant cinq minutes à une lumière ultraviolette profonde (longueur d'onde ≈ 180nm, référence : UVO Cleaner Unit 342) à travers un masque de chrome présentant des motifs micrométriques transparents (Annexe page 166). Cette étape d'insolation permet de détruire la fonction PEG sur les motifs exposés à la lumière ultraviolette et fait apparaître des groupes carboxyles (Azioune et al. 2009).

Il existe deux méthodes pour positionner la lamelle sur le masque. La première consiste à déposer une goutte d'eau de 0,5 µL entre les deux éléments. Ainsi, par capillarité, la goutte va s'étaler sur toute la surface de la lamelle et va la plaquer sur le masque. Une forte pression est ensuite appliquée à la main. La distance entre les deux éléments est alors d'environ 1 µm. Cette méthode requiert une certaine dextérité car il arrive que l'eau ne s'étale pas de manière homogène et que l'insolation 'bave' (Source étendue, Figure 38) à cause de la trop grande distance entre les deux éléments. Les motifs insolés peuvent donc être plus larges que les motifs imprimés sur le masque (voir ci-dessous).

La deuxième méthode consiste à plaquer les deux éléments à l'aide d'une pompe à vide. L'aspiration se fait au travers d'orifices percés dans une structure en aluminium, fabriquée avec l'aide de la plateforme de construction mécanique de l'UMR 168 (Annexe page 170) ; notre modèle est inspiré de celui développé par l'équipe de L. Blanchoin. Par cette méthode, les risques de 'bavures' sont réduits mais le risque de détériorer les motifs après décollage de la lamelle sont grands (voir paragraphe suivant).

La source lumineuse est une lampe d'environ 15x15 cm (source étendue) mise à une distance maximale de 8 cm du masque. Le masque de chrome est composé d'une couche de quartz (indice de réflexion n= 1,55). Dans cette configuration, au milieu de la chambre, l'angle de réfraction limite est de 40° (inférieur à l'angle d'incidence maximale due à l'étendue de la source 43°). Ainsi, pour un espacement d'un micron entre la lamelle et le masque, le motif est élargi au maximum de 1,7 µm au milieu de la chambre et de 0,85 µm sur les bords. Comparé à la largeur de 3 µm de certains motifs, cet effet n'est pas négligeable.

Après insolation, il faut décoller la lamelle du masque. Il est possible d'utiliser une pompe à vide pour aspirer la lamelle ou un morceau d'adhésif pour tirer dessus. Dans les deux cas, cette étape peut dégrader la couche restante de PLL-g-PEG. En tirant perpendiculairement au masque, les forces de cisaillement sont minimisées, ce qui réduit donc le risque de détérioration des motifs.

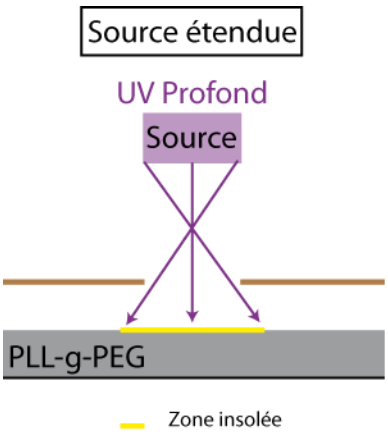


Figure 38 : Schéma de l'insolation. L'espace (épaisseur ~1 µm) entre la lamelle et le masque crée un motif dont la largeur est supérieure à celle imprimée sur le masque.

Dans les instants qui suivent l'insolation UV, la lamelle est posée sur une goutte de 35 µL de pWA à 1 µM diluée dans du 1xKMEI pour une incubation de 10

minutes. S'ensuit un rinçage dans un bain de 1xKMEI (≈15 mL) frais dans lequel est plongée la lamelle pour enlever l'excédent de pWA. Les lamelles fonctionnalisées se gardent un à deux jours au réfrigérateur.

Pour effectuer une polymérisation, les motifs sont disposés dans des chambres à flux (voir Figure 12). Quatre bandes d'adhésif double-face d'une largeur d'environ 2 mm et espacées également de 2 mm sont disposées en parallèle sur le fond extérieur d'une boîte de Pétri de diamètre 3,5 cm (dimension du porte échantillon ; voir page 66). Le côté fonctionnalisé de la lamelle est alors collé contre cette surface, ce qui crée trois canaux d'un volume d'environ 10 µl. Après injection de la solution souhaitée, le canal est scellé avec du vernis ou du Valap.

2. L'anti-photo-blanchiment

La visualisation des filaments d'actine en microscopie photonique se fait par l'intermédiaire de fluorophores attachés aux monomères (Ici de l'alexa fluor 568, Tab. A. 1). Malheureusement, le signal de fluorescence se dégrade après un certain nombre de cycles d'absorption/ émission : c'est le phénomène de photo-blanchiment.

Le photo-blanchiment intervient lorsque le fluorophore passe, après absorption d'un photon, dans un état triplet au lieu de retourner à l'état fondamental par émission d'un photon (fluorescence). Le retour à l'état fondamental depuis l'état triplet se fait dans un temps relativement plus long ; il s'agit du phénomène de phosphorescence. Depuis l'état triplet, le fluorophore peut aussi se transformer en une forme semi-oxydée ou semi-réduite présentant des radicaux libres très réactifs (Plaçais 2008). Par réaction avec l'oxygène, elles se détruisent, ou davantage détruisent la structure à laquelle elles sont rattachées (Figure 39). Le réseau de filaments d'actine s'en trouve fortement perturbé, jusqu'à sa disparition totale en quelques dizaines de secondes d'exposition.

Pour enrayer cet effet néfaste, il faut empêcher la génération de radicaux libres. Il existe deux approches. L'une consiste à réduire la durée de vie des états triplet et radicalaire. Pour cela, il est possible d'utiliser un agent réducteur comprenant un groupe thiol tel que le dithiothréitol (DTT), le mercaptoéthylamine (MEA) ou le β-mercaptoéthanol.

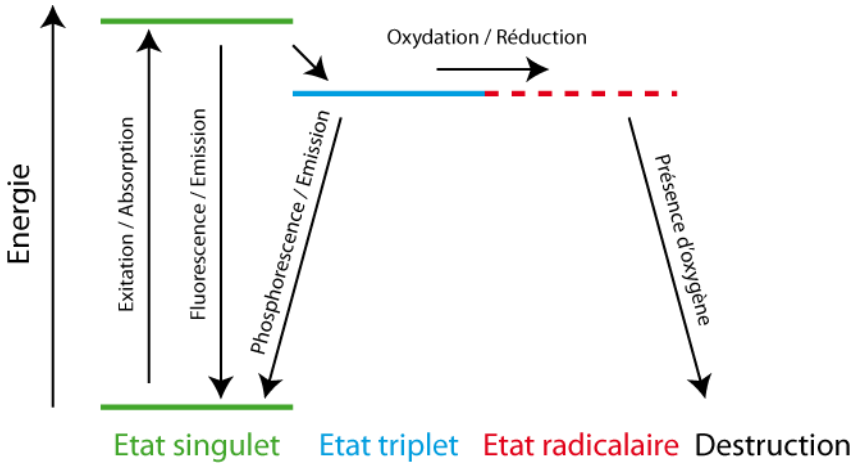


Figure 39 : Schéma de principe du comportement du fluorophore.

La seconde approche consiste à diminuer la quantité d'oxygène en solution. L'oxydation du glucose est un mécanisme classique pour atteindre cet objectif (Eq. 12). Afin que cette réaction domine, de la glucose oxydase est ajouté à la solution.

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,C_6H_{12}O_7 + 2\,H_2O_2 \qquad \text{Eq. 12}$$

Cependant, cette réaction d'oxydation crée un élément toxique : le peroxyde d'hydrogène. Une enzyme de l'eau oxygénée, la catalase, est ajoutée à la solution pour déclencher son auto-dismutation (Eq. 13).

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2 \qquad \text{Eq. 13}$$

Globalement, les réactions font disparaître l'oxygène dissous selon la relation :

$$2\,C_6H_{12}O_6 + O_2 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,C_6H_{12}O_7 \qquad \text{Eq. 14}$$

Dans nos expériences, nous utilisons à la fois le DTT et la réaction d'oxydation du glucose pour limiter l'apparition de radicaux libres. Les proportions utilisées sont reportées ci-dessous (Tab. 4).

Produit	Quantité
DTT	56 mM
Glucose	592 µM
Glucose Oxydase	4,7 Units/ml
Catalase	37,3 Units/ml

Tab. 4 Composition de l'anti-photo-blanchiment (APB). L'unité employée pour la glucose oxydase et la catalase correspond à une certaine activité des enzymes définie par le fournisseur (voir page 173).

3. Composition de la solution de polymérisation

Dans nos expériences, nous n'avons utilisé aucun générateur d'ATP. Il ne semble pas nécessaire puisque la consommation de l'ATP par l'actine et les myosines ne devrait pas faire descendre la concentration d'ATP en dessous de 2 mM après 30 minutes d'expérience (concentration initiale de 2,6 mM), ce qui n'affecte pas les dynamiques du système (Harada et al. 1990, De La Cruz et al. 1999, De La Cruz et al. 2009).

La solution injectée dans la chambre à flux pour polymériser le réseau d'actine est préparée en deux étapes dans un souci d'économie de produits compte tenu de leur temps de vie. Le 'tampon de fluorescence' (Tab. 5) renferme l'anti-photo-blanchiment (ABP, Tab. 4) et de la méthylcellulose, le tout à une concentration trois fois supérieure à la concentration finale. La méthylcellulose est un agent de déplétion (macromolécule) qui permet de plaquer les filaments d'actine sur la surface, et ainsi d'obtenir une structure bidimensionnelle. Ce tampon peut être conservé la journée

(sur glace) et sert de base pour préparer la solution finale de polymérisation (Tab. 6). Même en l'absence des protéines consommant l'ATP, comme l'actine et les myosines, la solution finale ne peut être conservée que quelques heures (probablement à cause de la dénaturation des protéines à basse concentration). Elle se prépare généralement quelques instants avant de réaliser l'expérience. L'actine et les myosines sont ajoutées au moment de l'injection car leurs activités sont immédiates.

Produit	Quantité
DTT	168 mM
Glucose	1,8 mM
Glucose oxydase	14 Units/ml
Catalase	112 Units/ml
Na_2ATP	2 mM
Méthylcellulose	2300 cPs
Tampon KMEI	1x

Tab. 5 Composition du tampon de fluorescence (TF). L'anti-photo-blanchiment (ABP) et la méthylcellulose sont trois fois plus concentrés que dans la solution finale (Tab. 6)

Produit	Quantité
BSA	0,1% w/w
Complexe Arp 2/3	10 nM
Profiline	12 µM
$MgCl_2$	2 mM
Na_2ATP	2,6 mM
Actine	3,2 µM
Actine fluo	0,8 µM
Méthylcellulose	800 cPs
Tampon KMEI+APB	1x

Tab. 6 Composition finale de la solution de polymérisation. Le tampon de fluorescence est dilué par trois par rapport au stock (Tab. 5).

B Billes couvertes de moteurs moléculaires

Nous décrivons ici comment adsorber, de manière non spécifique, des molécules de myosines purifiées à la surface de billes de polystyrène carboxylées d'un diamètre de 200 nm. Durant ce travail de thèse, trois types de myosines ont été utilisés : la Heavy-Mero Myosine II (HMM-II), purifiée à partir du muscle squelettique de lapin ; la Heavy-Méro Myosine V (HMM-V) (du poulet) et la myosine VI-GFP (du cochon), exprimées et purifiées par infection de cellules d'insecte SF9 avec le cADN codant pour la protéine d'intérêt (Tab. 7). Pour pouvoir les observer sous microscope, les billes sont de plus marquées par un fluorophore (Cy5 ou GFP).

	Poids moléculaire	Etiquette (Flag tag)	Marqueur fluorescent	Références
Myosine II HMM (HMM-II) *(M. Rief, TUM)*	350 kDa	aucune	aucun	Extraite et purifiée du muscle squelettique du lapin
Myosine V HMM (HMM-V) (*E. de la Cruz, Yale University)*	477,4 kDa	GDYKDDDDK	aucun	Exprimée par infection de cellules d'insecte SF9 (baculovirus) et purifiée (Olivares et al. 2006)
Myosine VI *E. de la Cruz, Yale University)*	359kDa	GDYKDDDDK	GFP	Exprimée par infection de cellules d'insecte SF9 (baculovirus) et purifiée (Rock et al. 2001)

Tab. 7 : Type, taille et marqueur des myosines utilisées durant cette thèse. La myosine II nous a été gracieusement fournie par *Professor* Matthias RIEF (Technische Universität München, Allemagne) à une concentration (stock) de 18,3 µM. Les myosines V et VI nous ont été gracieusement fournies par *Professor* Enrique DE LA CRUZ (Yale University, Etats-Unis) à des concentrations respectives de 16 µM et 44 µM.

1. Protocole de fonctionnalisation des billes

Nous prélevons 1 µl d'une solution stock de billes de polystyrène (densité : 1,06 ; référence F8807 – Life Technologie) à une concentration de 0,1% (1 ml de soltion ↔ 1 mg de billes), ce qui correspond à 1 µg de billes, et le rajoutons à 24 µl de 1xKEEI (Tab. A. 4). La densité du polystyrène étant de 1,06, la masse d'une bille de 200 nm de diamètre est de 4,44 fg ; nous avons donc $2{,}3\times10^{8}$ billes en solution. La solution est centrifugée à 20 000 g pendant trente minutes à 4°C. Nous prélevons 22 µl du surnageant et le remplaçons par 19 µl de 1xKEEI. Les billes sont remises en

suspension par trituration avant de subir une sonication de 30s permettant la dispersion des agrégats.

Nous rajoutons alors 3 µl d'une solution de myosines à une concentration de 0,44 µM, ce qui correspond à $7{,}92\times10^{11}$ molécules de myosine, laissons incuber 10 min sur glace, avant de rajouter 3 µl d'une solution de BSA à 10% pour passiver les interstices (Figure 40). Pour fabriquer des billes 'passives' et passivées, il suffit d'omettre l'étape d'ajout des moteurs et d'ajouter à la place 3 µL de 1xKMEI. Après une seconde incubation (si des moteurs sont ajoutés), les billes sont de nouveau centrifugées ; le surnageant (25 µl) est alors retiré. Il faut veiller à ce que les billes restent immergées, sans quoi les moteurs perdraient leur activité. Il est à noter que si tous les moteurs se retrouvaient à la surface des billes, il y aurait 3440 moteurs par bille. Cela correspondrait à une densité surfacique d'environ 27000 moteurs/µm^2, c'est-à-dire à une distance moyenne entre moteurs de 6 nm. Cette densité est très supérieure (×60) à la densité minimale nécessaire dans un test de motilité pour qu'il y ait à chaque instant au moins une molécule de myosine II au contact de l'actine, assurant ainsi une vitesse de mouvement maximale (Tab. 2). En utilisant une quantité si importante de moteurs, nous espérons saturer la surface des billes.

Le rendement de ce protocole dépend du type de moteur utilisé ; en particulier, il se forme un grand nombre d'agrégats de billes avec les myosines V et VI. La dernière étape consiste donc à diluer les billes avec du tampon M (Tab. A. 5) pour rééquilibrer les concentrations (Tab. 8). Les billes se conservent sur glace pendant une journée.

Moteur	Quantité
Aucun	47 µl
Myosine II HMM	47 µl
Myosine V HMM	9,5 µl
Myosine VI	9,5 µl

Tab. 8 Volume de tampon M ajouté selon le type de moteur lors de la dernière étape de fonctionnalisation des billes.

Il est à noter que la BSA n'est pas un très bon agent passivant. Environ 50% des billes couvertes de BSA collent à la surface d'une lamelle de verre, même si cette dernière a été couverte d'une couche de PLL-g-PEG. Un meilleur résultat (80% de billes mobiles) est obtenu en utilisant des billes passivées au PEG (Valentine et al. 2004). John Manzi, du plateau technique de Biologie Moléculaire et Biochimie (BMB) de l'UMR168, a produit ces billes pour ce travail de thèse en utilisant le protocole de Valentine (Annexe page 176). Cependant, la passivation par le PEG n'est malheureusement pas compatible avec la présence de myosines à la surface des billes ; pour garder les billes actives nous avons dû conserver la BSA comme agent de passivation.

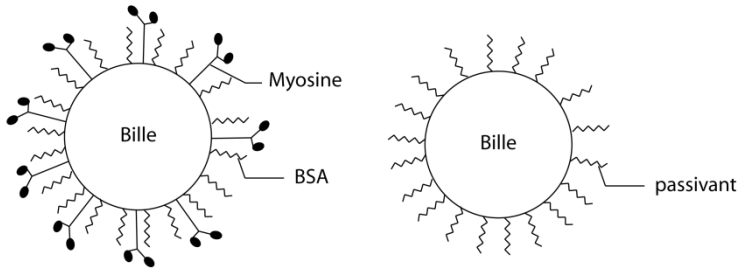


Figure 40 : Schéma d'une bille 'active' recouverte de myosine et d'une bille 'passive' recouverte d'une couche de BSA ou de PEG5000.

2. Estimation du nombre de moteurs par bille.

L'estimation du nombre de moteurs par bille se fait en deux étapes. Nous travaillons avec 5 µg de billes qui ont été recouvertes de moteurs en suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent. Pour éliminer les moteurs qui ne s'adsorbent pas sur les billes et restent en solution, nous effectuons 3 cycles de centrifugation (20000 g pendant 30 min à 4°C) et remplaçons le surnageant par du KMEI. Le volume total de la solution est V= 50 µl. La première étape consiste à mesurer la densité massique de billes ρ_b dans l'échantillon à partir d'une mesure de turbidité par absorbance à une longueur d'onde de 600 nm (Figure 41.A). Nous effectuons au préalable une calibration en utilisant des solutions de billes de concentrations connues ; la relation entre l'absorbance et la concentration de billes est linéaire dans une gamme de concentrations de 0 à 0,4 mg/g (Figure 41.A). La fonctionnalisation des billes par les myosines II HMM ne génère pas de pertes de billes (rendement de 100%), contrairement à la fonctionnalisation par les myosines V HMM (rendement de ~25% car les billes s'agrègent). A partir de l'estimation de la concentration massique de billes et du volume V_b d'une bille, le nombre de billes N_b dans l'échantillon est calculé par la formule :

$$N_b = \rho_b \frac{V}{V_b},$$

Dans laquelle nous avons considéré que la masse volumique des billes est égale à la masse volumique de l'eau.

Dans une deuxième étape, la masse m_m de moteurs dans l'échantillon (i.e. : sur les billes) est mesurée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-page), un détergent qui permet de décrocher les moteurs des billes (Figure 41.B). L'intensité des bandes de protéines permet d'avoir une estimation de la quantité de moteurs sur les billes (Figure 41.C). Nous noterons que ce test ne fonctionne que pour une masse totale de protéines supérieure à 100 ng.

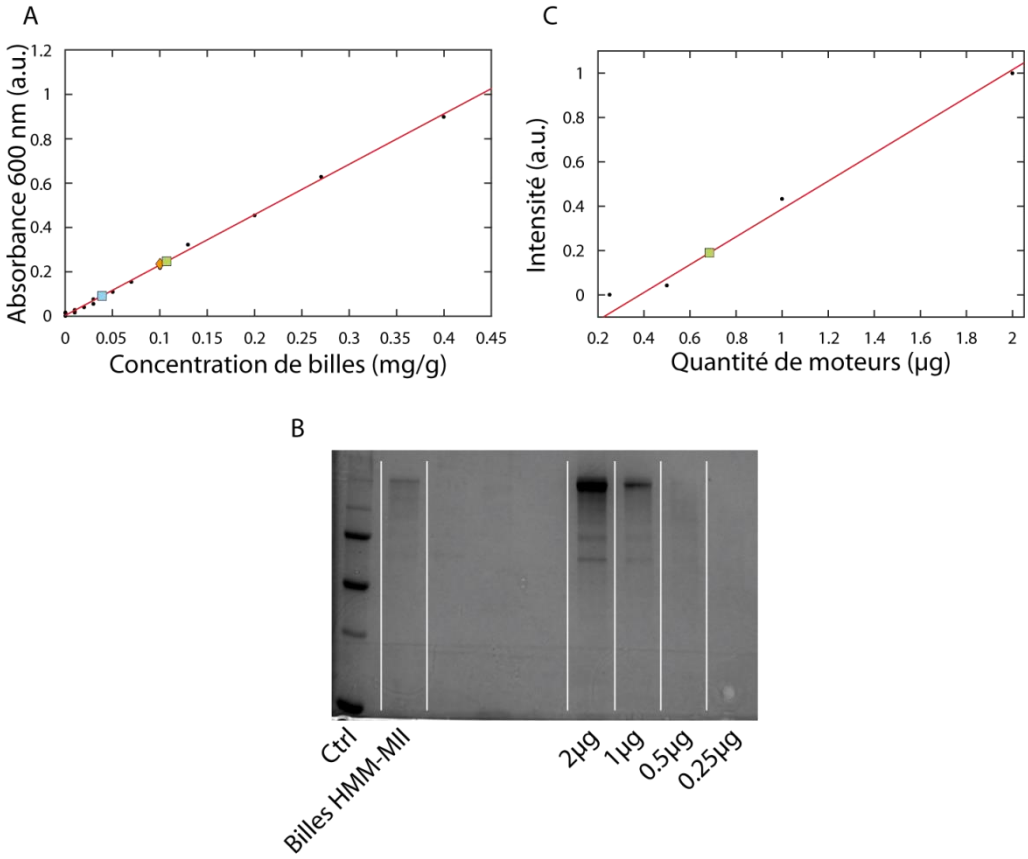


Figure 41 : Estimation du nombre de myosines adsorbées sur une bille. A : estimation par turbidité de la concentration de billes dans l'échantillon. Points noirs : calibration effectuée à partir des concentrations indiquées par le fabriquant. Ligne rouge : régression linéaire sur les points de calibration (y=2,27x+0,0031, R^2= 0,9989). Carré vert : billes fonctionnalisées avec la myosine II HMM. Carré bleu : billes fonctionnalisées avec la myosine V HMM. Losange orange : valeur théorique (si le rendement est 1, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de perte de billes). B : gel SDS-Page. C : Intensité du gel SDS-page selon la concentration de myosines II HMM. Points noirs : calibration. Ligne rouge : régression linéaire sur les points de calibration (y=0,254x+0,097, R^2=0,9929). Carré vert : billes fonctionnalisées avec la myosine II HMM.

A partir de ces données et du poids moléculaire MW du moteur, le nombre de moteurs N par bille s'exprime par :

$$N = \frac{1}{N_b} \times \left(\frac{m_m}{MW} \times N_a\right) \text{ molécules.bille}^{-1} \qquad \text{Eq. 15}$$

Connaissant la surface S_b d'une bille, la concentration surfacique C de moteurs par bille vaut :

$$C = \frac{N}{S_b} \text{ molécules/µm}^2 \qquad \text{Eq. 16}$$

Cette concentration est de 7320 molécules/µm² pour les billes recouvertes de myosines II HMM, ce qui correspond à 920 molécules par bille et à la présence d'une myosine tous les 12 nanomètres. Le rendement de fonctionnalisation est de 28%.

C Activité *in vitro* des protéines

1. Test de motilité

a. protocole

Durant cette thèse, la concentration de myosines utilisées pour les essais de motilité est tellement importante que la densité surfacique de moteurs est probablement supérieure à la valeur de 450 molécules.µm^{-2}. Des travaux antérieurs indiquent que les vitesses des filaments mesurées ne dépendent alors plus de la concentration en myosine et qu'elles saturent à une valeur maximale (voir page 37). Les expériences sont réalisées à une température de 22°C (climatisation de la pièce), à un pH de 7,8 et à la concentration en chlorure de potassium de 50 mM (Annexe page 173).

Deux jours avant l'expérience, nous préparons une solution d'actine filamenteuse à une concentration de 5 µM en présence de phalloïdine marquée (marqueur fluorescent : Alexa fluor 568) à une concentration de 5,5 µM. La phalloïdine permet de stabiliser les filaments afin de pouvoir observer des filaments uniques en solution diluée (sans cela, ils dépolymériseraient). Le ratio actine : phalloïdine étant de 1:1,1 (Tab. A. 10), le filament est entièrement décoré.

Le jour même, il faut en premier lieu préparer une lamelle couverte d'une fine couche de nitrocellulose (Figure 43). Pour cela, une lamelle de verre de 22x22 mm est nettoyée avec de l'acétone puis essuyée avec un papier Kimwipe®. Une goutte de 20 µl de nitrocellulose diluée à 0,1% w/v dans de l'amylacetate (solvant volatil) est déposée au centre. Le produit est étalé pendant 1 min à l'aide d'une tournette ('SpinCoater') dont la vitesse de rotation est réglée à 3000 tours par minute. Il est également possible de répartir uniformément la goutte sur la surface et d'attendre 1h30 que le solvant s'évapore. Cependant, en plus de la perte de temps (1h30), la seconde méthode produit une couche inhomogène (Figure 42) (Plaçais 2008).

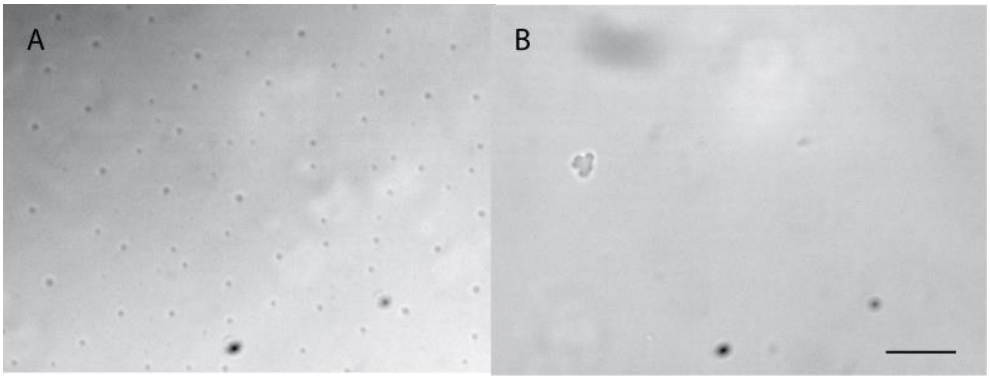


Figure 42 : Dépôt de nitrocellulose. A : Dépôt par évaporation (on remarque des défauts). B : Dépôt par enduction centrifuge ('spin coating'). Echelle : 10 µm

Trois ouvertures rectangulaires d'environ 2x24 mm² sont ensuite découpées dans un rectangle de Parafilm®. Ce dernier est positionné sur la lamelle couverte de nitrocellulose puis recouvert d'une lamelle de verre 18x18 mm². Le plastique est alors fondu à l'aide d'un cube de laiton chaud afin de souder les différentes parties entre elles. L'excédent de Parafilm® est découpé en prenant soin de laisser une marge d'un

millimètre sur les entrées des canaux ainsi qu'une languette sur le côté (Figure 43). La languette facilite le retrait de la chambre du microscope. Il est aussi possible d'utiliser de l'adhésif double face au lieu du film plastique. Ces lamelles se conservent une journée à température ambiante.

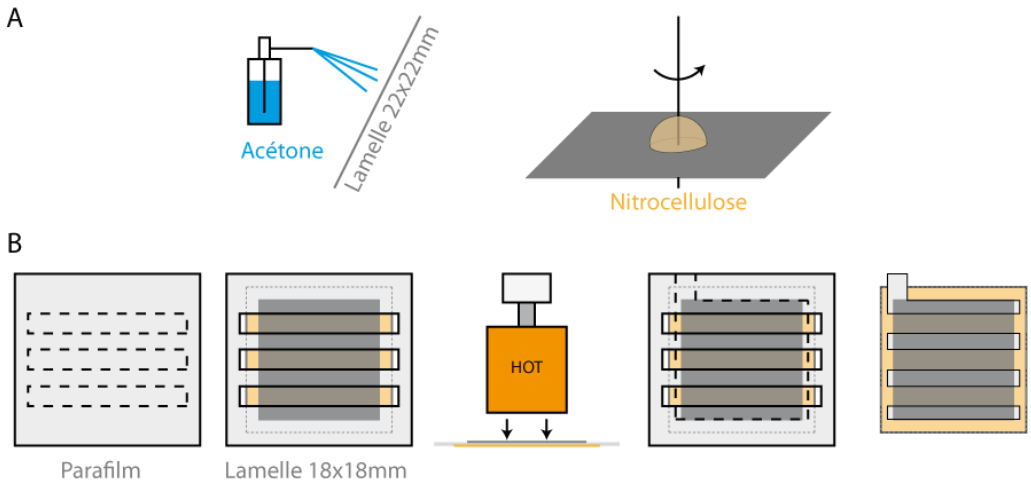


Figure 43 : Illustration de la préparation des canaux de nitrocellulose pour les tests de motilité. A : Dépôt de nitrocellulose. B : Création des canaux.

Pour la suite, les produits suivants sont décongelés sur glace :

- Glucose (-20°C)
- Catalase (-20°C)
- Glucose Oxydase (-20°C)
- ATP (-20°C)
- DTT (-20°C)
- Myosine (-80°C ou -20°C)
- Tampon G, Tampon Filament et 10xKMEI (-20°C)
- BSA (-20°C)

L'actine filamenteuse est ensuite diluée dans du 1xKMEI pour amener sa concentration à 80 nM et la solution finale, privée de glucose, d'ATP et de filaments, est préparée (Tab. A. 11). Tout est conservé sur glace. Un volume de 10 µL de myosines à une concentration de 0,4 µM dans du 1xKMEI est injecté dans un canal. Après 4 minutes, la chambre est rincée avec 50 µl de BSA dissous à 1‰ (w/w) dans du 1xKMEI. Cette étape permet de passiver les interstices existant entre les moteurs. De nouveau après 4 minutes, la solution finale, incorporée des derniers éléments manquant, est injectée immédiatement pour observation sous microscope.

Remarque : pour changer la solution d'un canal, il faut d'abord ajouter une goutte à l'une des ouvertures du canal pour ensuite aspirer avec un Kimwipe® le fluide de l'autre côté.

b. Résultat : vitesse de nos myosines

Les positions des filaments sont relevées au cours du temps par l'intermédiaire du module TrackMate du programme d'analyse d'images Fiji (Figure 44, paramètres page 156). Pour éliminer les artéfacts dus au bruit de fond de la vidéo, seules les trajectoires plus longues que 2 microns et durant plus de 7,5s sont retenues pour l'analyse.

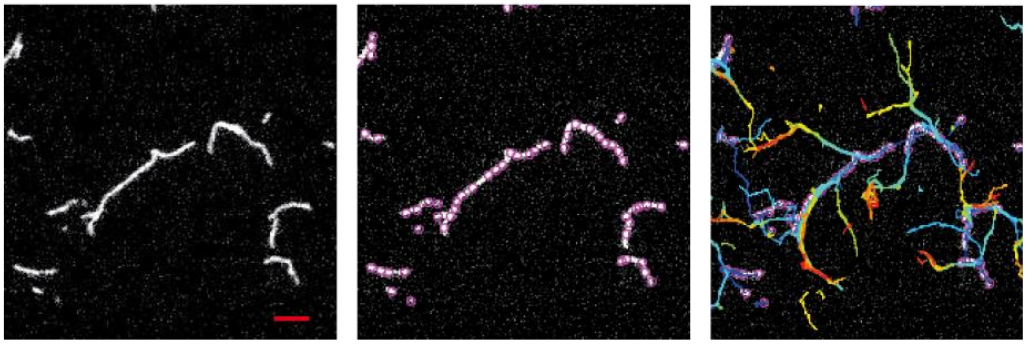


Figure 44 : Détection de trajectoires de filaments d'actine. A gauche : Image de fluorescence de filaments d'actine déposés sur une surface de myosines. Echelle 2 µm (segment rouge). Au centre : Détection des filaments d'actine par TrackMate. A droite : reconstruction des trajectoires par TrackMate.

On obtient les résultats suivants (Figure 45) :

Type de myosine	vitesse ± écart type
Myosine II HMM	2 ± 1,4 µm/s (n= 458)
Myosine V HMM	460 ± 550 nm/s (n= 134)
Myosine VI	450 ± 500 nm/s (n= 137)

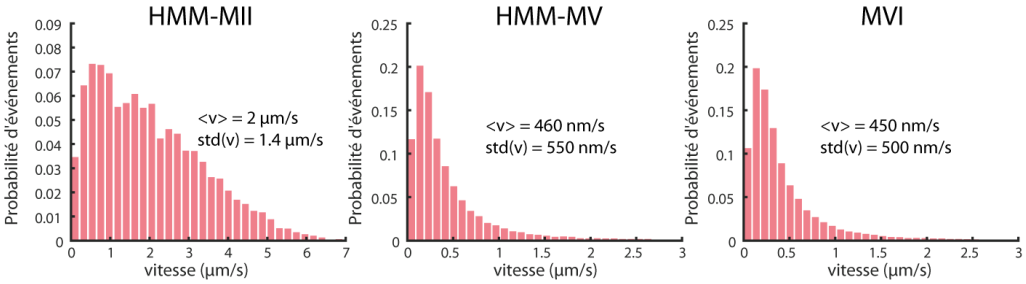


Figure 45 : Vitesses de filaments d'actine dans des essais de motilité selon le moteur.

2. Le 'test pyrène' : dynamique de polymérisation de l'actine

a. Protocole

Le sulfhydryle N-(1-Pyreny1)iodoacetamide –appelé communément le 'pyrène'– forme une liaison covalente avec la cystéine Cys-374 du monomère d'actine. Il s'agit

d'un marqueur fluorescent (longueur d'onde d'excitation : 365nm ; longueur d'onde d'émission : 407 nm) qui présente la particularité d'être 25 fois plus fluorescent quand l'actine est sous forme filamenteuse que lorsqu'elle est sous forme globulaire (Kouyama et al. 1981 ; Figure 46). Cette propriété permet de caractériser la dynamique de polymérisation de l'actine en suivant l'évolution temporelle du signal de fluorescence. Il est possible d'en déduire la vitesse de nucléation, c'est-à-dire le nombre de bouts barbés qui apparaît par unité de temps et de volume (en nM/min) en début de polymérisation, la vitesse de polymérisation des filaments et le nombre total de bouts barbés (par unité de volume) qui a été formé à la mi-parcours (voir Annexe page 177). Le pyrène n'altère pas les propriétés de l'actine (Cooper et al. 1983).

Au minimum deux jours avant l'expérience, l'actine classique et l'actine pyrène sont diluées à 40 µM. Le jour du test, les différentes protéines d'intérêt sont décongelées sur glace (complexe Arp2/3, profiline, pWA, etc.). Un mélange des deux types d'actine est effectué dans un ratio de 1:1. Le volume de la solution à tester est de 50 µl. Cette solution est tout d'abord préparée sans y incorporer l'actine. L'actine est ajoutée seulement quelques instants avant la mesure de fluorescence par un spectrophotomètre (LS-50B PerkinElmer). La longueur d'excitation est fixée autour de 365 nm avec une fenêtre de 5nm. L'intensité de fluorescence de l'échantillon est enregistrée toutes les secondes pendant 20 minutes. L'origine des temps correspond à l'instant où l'actine est injectée, environ 10 secondes avant la première mesure.

b. Caractérisation de nos protéines

Au cours de travail de thèse, il a été nécessaire d'utiliser différents stocks de protéines, dont l'activité peut varier d'un stock à l'autre. Il est ainsi utile d'utiliser le test pyrène pour caractériser l'activité de protéines d'un stock donné, afin de s'y référer par la suite. Pour caractériser l'effet d'une protéine (ou d'un groupe de protéines) sur le processus de polymérisation, la dynamique de fluorescence de l'actine-pyrène est mesurée en présence de la protéine ou sans elle (contrôle). La Figure 46 présente une telle caractérisation pour les protéines suivantes :

1. Profiline 'jeune' (rouge)
2. Profiline 'âgée' (vert)
3. Contrôle (actine seule ; bleu)
4. Profiline 'âgée', Complexe Arp2/3, GST-pWA (orange)
5. Profiline 'jeune', Complexe Arp2/3, GST-pWA (gris)
6. Profiline 'jeune', Complexe Arp2/3, strep-pWA (noir)

Comme il était possible de s'y attendre (voir page 17), la profiline diminue la vitesse de nucléation (0,36 →~0,01 $nM.min^{-1}$), la vitesse de polymérisation (1,4 → 0,2 $\mu M.min^{-1}$) ainsi que le nombre de bouts barbés obtenu (0,5 → 0,09 nM) par rapport à une polymérisation en présence d'actine seule. Avec le temps (âge de la protéine), la profiline perd de son activité. A l'opposé, lorsque le complexe arp2/3 et son activateur le pWA à la profiline 'jeune' sont ajoutés, la vitesse de nucléation

(0,35 → ~0,9nM.min^{-1}) et la vitesse maximale de polymérisation doublent (1,4 → 2,8 µM.min^{-1}), alors que le nombre de bouts barbés quadruple (0,5 → 2 nM) par rapport à la situation de contrôle.

Le pWA peut être associé à d'autres molécules telles que la streptatividine (strep) ou la glutathion S-transférase (GST). Ces modifications changent l'efficacité d'activation du complexe Arp2/3. Ainsi, le strep-pWA nuclée davantage que le GST-pWA (1 comparé à 0,8 nM.min^{-1}). En revanche, la vitesse de polymérisation (2,8 µM.min^{-1}) et le nombre de bouts barbés (2 nM) ne sont pas modifiés. Dans nos expériences, nous avons utilisé le strep-pWA.

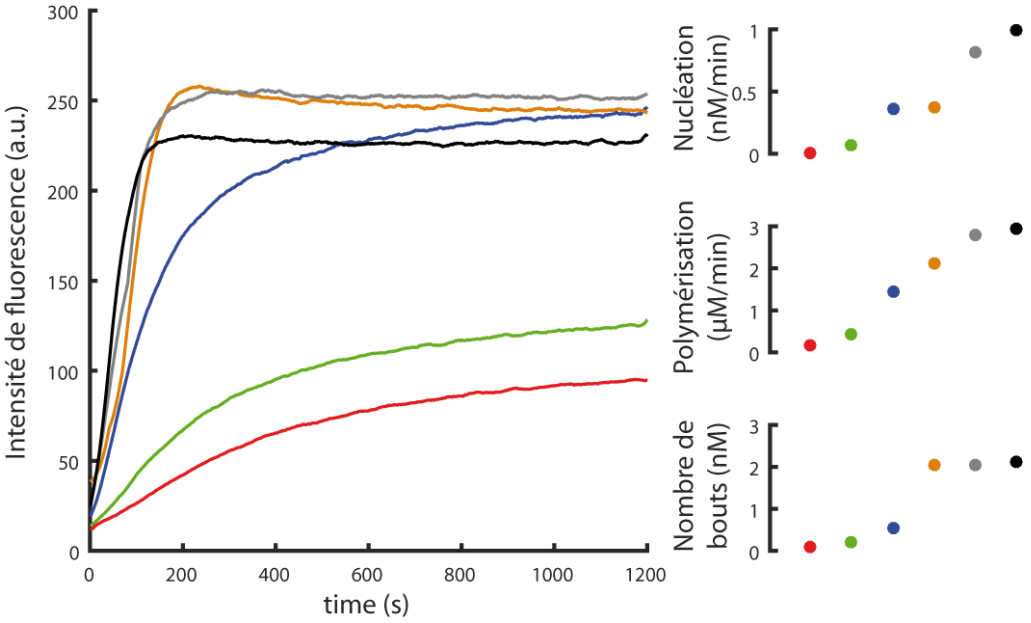


Figure 46 : Dynamique de polymérisation observée par test pyrène. A gauche, intensité de fluorescence de l'actine-pyrène en fonction du temps. A droite de haut en bas, la vitesse de nucléation estimée au début de la polymérisation, la vitesse maximale de polymérisation et le nombre de bouts associé. Ces différentes constantes sont calculées à partir des constantes cinétiques d'association et de dissociation du bout barbé, respectivement 12 µM.s^{-1} et 1,5 s^{-1} en l'absence de profilines et 8 µM.s^{-1} et 2 s^{-1} en présence de profilines. Les expériences sont faites en présence de 5 µM d'actine dans du tampon G (Tris 2 mM, CaCl2 0,2 mM, DTT 0,2 mM, ATP 2 mM). Un code couleur est utilisé pour différencier les différentes protéines associées à l'actine. Rouge : profiline 'jeune'. Vert : profiline 'âgée'. Bleu : actine seule. Orange : profiline 'âgée', complexe Arp2/3 et GST-pWA. Gris : profiline 'jeune', complexe Arp2/3 et GST-pWA. Noir : profiline 'jeune', complexe Arp2/3 et strep-pWA. La profiline est injectée à une concentration de 15 µM (ratio 1:3), le complexe Arp2/3 à 50 nM et le pWA à 2 µM. (Expérience réalisée par Camille Simom et Majdouline Abou-Ghali, doctorantes de UMR 168)

Les effets des différentes protéines associées à l'actine (ABP) sont en accord avec la littérature.

D Microscopie, acquisition des données et traitement de l'image

1. Microscopie

Les expériences ont été réalisées à la plateforme d'imagerie 'Nikon Center' de l'institut Curie. La température est fixée à 27°C par un dispositif utilisant l'effet Peltier (Annexe page 172). Les filaments d'actine et les billes sont visualisés en microscopie de fluorescence à l'aide d'un microscope confocal à disque rotatif ('Spinning Disk Confocal Microscopy') et de l'interface Méthamorph™. Il est à noter que le microscope utilisé, qui est en usage commun avec un grand nombre d'utilisateurs, opère généralement à une température de 37°C adaptée à la culture cellulaire. A cette température, certaines protéines ne fonctionnent plus *in vitro*. Afin de minimiser au maximum le temps de refroidissement, et donc de conserver plus de temps pour réaliser nos mesures, nous avons décidé de baisser la température de seulement 10°C plutôt que de travailler à une température plus habituelle de 21°C.

Les images ont été obtenues à l'aide d'une caméra Coolsnap HQ². Cette caméra est équipée d'un capteur avec une taille de pixel de 6,45×6,45 µm². Nous avons utilisé des objectifs à air de grandissement ×20 (PlanApo ; NA= 0,75) pour la visualisation du mouvement des billes et ×40 (CFI PlanFluor ; NA= 0,75) pour la caractérisation du profil de densité des réseaux d'actine dans lesquels évoluaient les billes. Compte tenu de la taille du pixel de la caméra, il en résulte un maillage dans le plan de l'échantillon dont la maille vaut respectivement 322,5 nm et 161,25 nm. L'utilisation d'un objectif avec un grandissement relativement faible nous a permis de visualiser simultanément plusieurs centaines de billes, et ainsi de pouvoir effectuer des moyennes d'ensemble statistiquement fiables.

2. Acquisition des données

Afin d'obtenir la dynamique de mouvement des billes, nous enregistrons une image de l'échantillon en excitant successivement les longueurs d'ondes correspondant aux différents types de billes présentes (GFP et/ou Cy5), avec un temps d'exposition fixé à 400 ms. La résolution temporelle de la détection est donc fixée à $\Delta t = 3$ s. Le réseau d'actine est imagé au début de l'expérience à $t = 10$ min et à la fin de l'expérience à $t = 30$ min. L'origine des temps est fixée à l'instant où nous injectons les solutions de polymérisation et les billes dans la chambre expérimentale. Il est à noter que l'anti-photo-blanchiment ralentit mais ne supprime pas les phénomènes de blanchiment de l'actine marquée (Figure 47). C'est la raison pour laquelle nous ne prenons généralement que deux images du réseau d'actine au cours de l'expérience et que la puissance du laser est aussi faible que possible, quitte à augmenter les temps de capture. Pour caractériser plus finement la dynamique de croissance du réseau d'actine, nous avons cependant réalisé quelques expériences dans lesquelles nous avons imagé le réseau toutes les 5 min (5 images). L'utilisation d'un objectif à immersion à huile, en augmentant l'ouverture numérique, permettrait d'augmenter l'efficacité de l'éclairage, et donc de travailler avec des puissances lumineuses plus faibles.

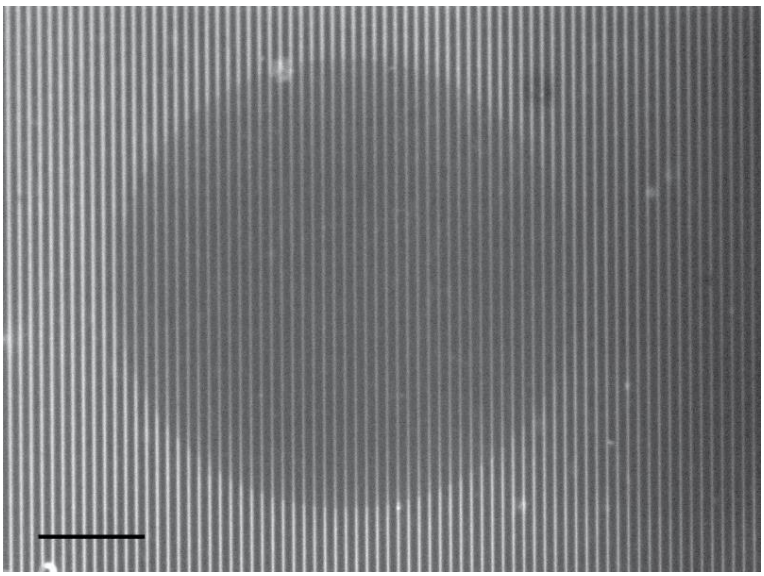


Figure 47 : Effet de l'observation sur le réseau de filaments d'actine. Réseau polymérisé à partir de lignes parallèles large de 3 µm et espacées de 30 µm, visualisé avec un grandissement de 4x après une exposition avec un grandissement de 20x. Echelle 300 µm.

3. Traitement d'image et analyse des réseaux d'actine

a. Transformation spatiale et relevé des coordonnées du réseau

Nous avons observé une dérive de l'échantillon dans le plan d'observation à une vitesse pouvant atteindre 1 µm.min^{-1} ; il est nécessaire de la corriger. Pour cela, nous appliquons la macro 'Template Matching' (https://sites.google.com/site/qingzongtseng/template-matching-ij-plugin) du programme d'analyse d'image ImageJ. Dans nos expériences de billes, nous utilisons des réseaux d'actine fabriqués à partir de lignes de nucléation (Chapitre IIIA). Une rotation est appliquée aux images pour aligner l'axe longitudinal des lignes de nucléation avec l'axe Y de notre référentiel, et donc l'axe des filaments d'actine qui en émergent avec l'axe X. Nous utiliserons cette convention dans toute la suite du document. Ces traitements introduisent des zones noires dans l'image que nous supprimons pour éviter que des objets fantômes ne soient détectés à l'intersection entre les différentes zones. La largeur des lignes de nucléation peut dévier de celle des lignes du masque de chrome utilisé pour imprimer le motif par photolitographie UV (voir page 51 et suivantes). Nous mesurons donc la largeur de ces lignes et la période du motif obtenu, ainsi que la position du milieu de l'une des lignes pour définir une origine à notre repère XY.

Les différentes constantes nécessaires aux analyses de l'expérience sont alors enregistrées manuellement dans un fichier texte nommé 'Scale.txt' dans l'ordre qui suit :

Echelle suivant l'axe X	(µm/pixel)
Echelle suivant l'axe Y	(µm/pixel)
Echantillonnage temporel	(s/image)
Position du centre d'une ligne	(numéro du pixel)
Période du motif (ou -1 si pas de période	(pixels)
Largeur d'une ligne de nucléation	(pixels)
Deuxième largeur si elle existe (motif asymétrique)	(pixels)

b. Mesure du profil de densité d'un réseau d'actine

L'image du réseau d'actine est importée sous Matlab® pour être analysée avec un programme que nous avons développé. La mesure de l'intensité de la lumière, émise par une bille fluorescente déplacée dans le plan d'observation, révèle que l'illumination de l'échantillon est inhomogène (Figure 48). Lors d'une acquisition d'une image d'un réseau d'actine, cette inhomogénéité d'illumination est gênante car elle laisse croire que la densité du réseau varie d'une zone à l'autre de l'échantillon alors que ce n'est pas nécessairement le cas.

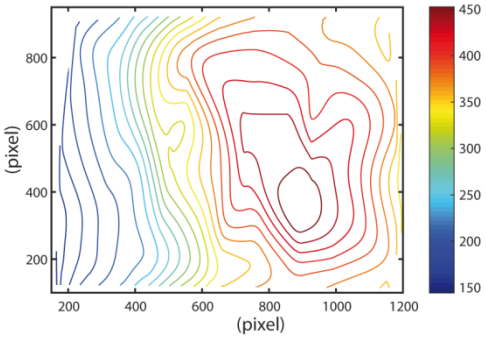


Figure 48 : Cartographie de l'intensité d'illumination dans le plan d'observation. La mesure est effectuée en mesurant l'intensité de la lumière émise par une bille fluorescente (Ø 200 nm, TetraSpect™, Life Technology T7280) collée sur une lame de verre et en déplaçant la lame de verre dans le plan d'observation. 1 pixel correspond ici à 161,25 nm.

En considérant que les lignes de nucléation doivent avoir une intensité de fluorescence homogène sur l'ensemble du champ visualisé, nous avons effectué une interpolation linéaire entre les intensités de ces lignes de référence pour créer une matrice de correction (Figure 49.A-D). La correction est ensuite appliquée à l'image du réseau d'actine. L'intensité de fluorescence, mesurée suffisamment loin d'une ligne de bordure du motif de nucléation, devrait être nulle car il n'y a pas d'actine dans cette zone. En

fait, cette intensité 'zéro' n'est pas nulle (en pratique elle vaut 90-100 unités) à cause du bruit inhérent au dispositif d'imagerie ; elle est donc soustraite à l'image. Nous calculons enfin un profil de densité de fluorescence moyen sur une période du réseau. Pour cela, nous effectuons d'abord une moyenne suivant l'axe Y des profils d'intensité de fluorescence puis, dans le cas d'un motif périodique, un repliement suivant l'axe X est appliqué (Figure 49.E-F).

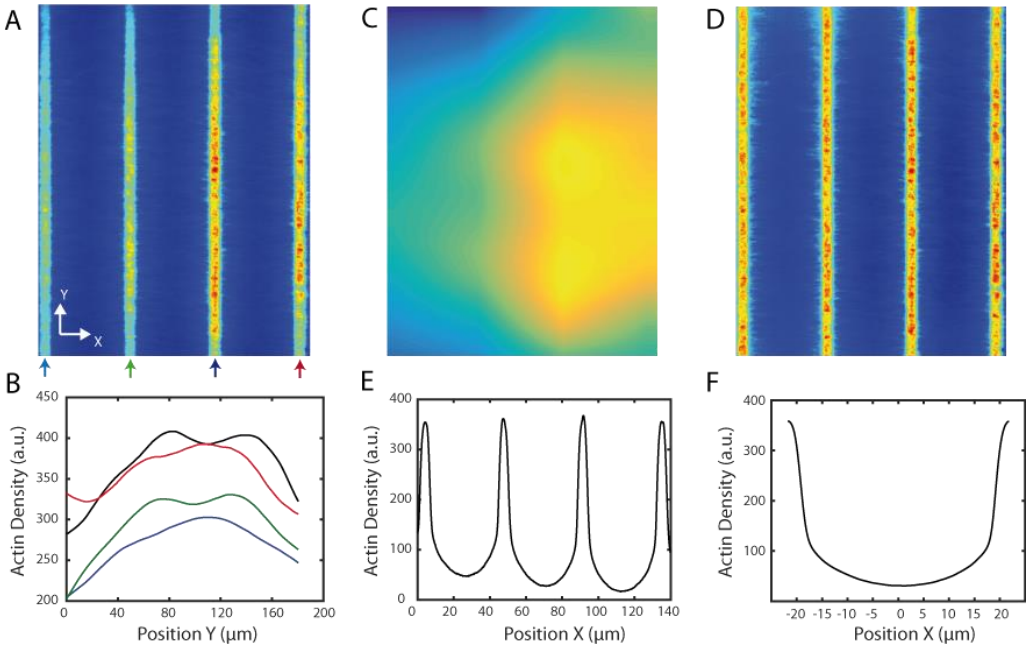


Figure 49 : Le réseau de filaments d'actine. De l'image brute au profil. A. Image brute du réseau. B. Profil d'intensité le long de différentes lignes de référence (axe Y). C. Matrice de correction. D. Image corrigée. E. Profil d'intensité suivant l'axe X après une moyenne suivant l'axe Y. F. Profil moyen après repliement suivant l'axe X.

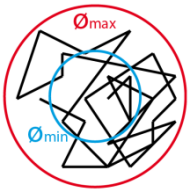
4. Détection et analyse de trajectoire de billes

Nous utilisons Fiji (https://fiji.sc/), une évolution du logiciel ImageJ dédiée au traitement de l'image par le biais d'une batterie de sous-programmes (macros) spécifiques. La macro 'TrackMate' (http://imagej.net/TrackMate#Single_Particle_Tracking) permet de détecter la position des billes sur chacune des images d'une vidéo ; toutes les vidéos ont été traitées avec les mêmes paramètres (Paramètres page 156). Cette macro a été développée par Nick Perry, Jean-Yves Tinevez, Johannes Schindelin et est distribuée gratuitement sur internet. Les trajectoires sont exportées pour être analysées sous Matlab® à l'aide d'une interface graphique (GUI) que nous avons développée.

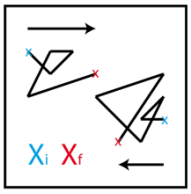
a. Filtrage des trajectoires

Une batterie de filtres a été développée afin de pouvoir trier les trajectoires :

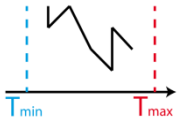
Exploration spatiale
Sélection des billes selon la distance explorée dans une ou deux dimensions.



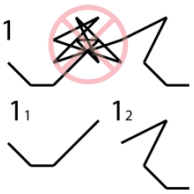
Déplacement global
Sélection des billes selon leurs sens de déplacement sur l'axe X entre l'instant initial et l'instant final.



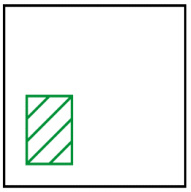
Exploration temporelle
Sélection des billes selon la durée des trajectoires.



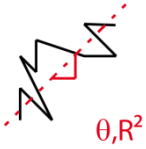
Billes mobiles
Suppression des périodes d'immobilisation. (lorsqu'une bille se colle, la partie fixe de la trajectoire est coupée).



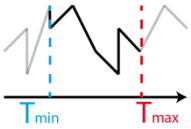
Zones spatiales
Définition d'une région spatiale d'intérêt (ROI) périodique ou non.



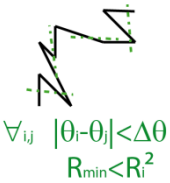
Directionnalité
Sélection des trajectoires selon leurs directions et la qualité de la régression linéaire. (Annexe page 157)



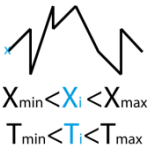
Zones temporelles
Définition d'un intervalle temporel d'intérêt.



Segment dirigé
Sélection des segments dirigés des trajectoires (Annexe page 157)



Positions initiales
Sélection des billes selon leurs positions spatiales et temporelles initiales.



Dans nos expériences, environ 50% des billes sont immobiles. Une bille est considérée immobile dès lors que sa trajectoire s'inscrit dans un disque dont le diamètre est inférieur à 2 µm. Les autres billes sont dites mobiles mais peuvent néanmoins s'arrêter au cours de leur trajectoire. Dans la majorité des cas, l'arrêt est définitif. Nous dirons qu'une bille 's'arrête' si l'écart type de son mouvement demeure inférieur à 0,1 µm pendant une période d'au moins 45 s. Une trajectoire présentant N>1 arrêts est découpée en N+1 'trajectoires mobiles'. En moyenne, il y a 0,75 arrêts par trajectoire. Expérimentalement, la suppression des parties immobiles des trajectoires s'avère nécessaire pour l'étude de la dynamique des billes (Figure 50). Dans ce manuscrit, toutes les estimations des vitesses et des diffusions locales des billes sont faites à partir de 'trajectoires mobiles', c'est-à-dire après soustraction des parties immobiles des trajectoires.

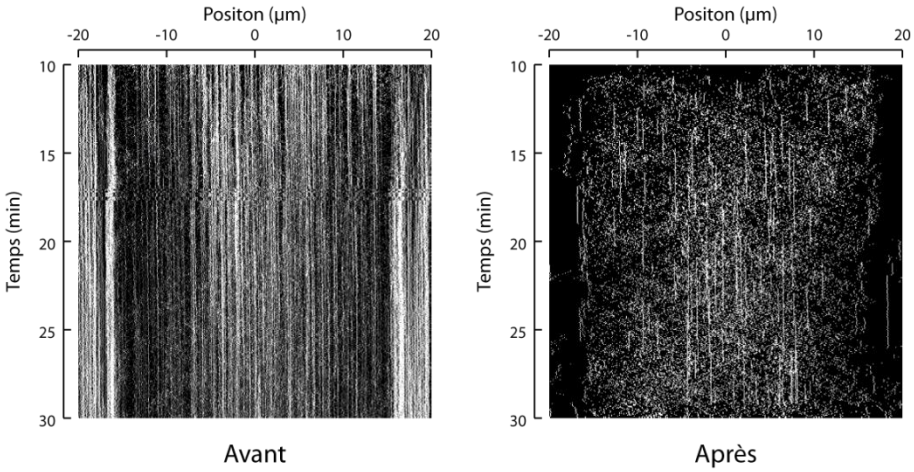


Figure 50 : Kymographe des trajectoires de billes passives BSA avant et après suppression des parties immobiles. A gauche : toutes les trajectoires. A droite : les intervalles mobiles des trajectoires des billes.

b. Estimation de la distribution stationnaire des billes dans un réseau antiparallèle

Idéalement, nous aurions préféré injecter des billes dans un réseau d'actine préformé puis faire en sorte que les billes commencent à interagir avec le réseau toutes en même temps. Dans nos expériences, les billes sont en fait en suspension dans le bain et injectées en même temps que la solution de polymérisation. Comme leur densité massique (Polystyrène : 1,06 $kg.L^{-1}$) est à peine supérieure à celle de l'eau, elles sédimentent lentement vers la surface de polymérisation. Ainsi, le nombre de billes en interaction avec le réseau d'actine croît au cours du temps. Lors de l'acquisition de d'une image des billes, cette image comprend donc des billes 'jeunes', qui sont en interaction avec l'actine depuis peu de temps, et des billes 'agées' qui ont eu le temps d'explorer le réseau pour se mettre à l'équilibre avec celui-ci. Afin de pouvoir estimer la distribution de position des billes à l'état stationnaire, il est nécessaire de trier les billes en fonction du temps qu'elles ont passé dans le réseau. Pour déterminer cette durée d'équilibration, nous avons suivi une procédure en trois étapes. Tout d'abord, les temps d'apparition des billes dans le réseau, qui sont tous différents, sont mis à zéro : cela revient à reconstruire une expérience idéale (virtuelle) dans laquelle les billes apparaissent toutes au même instant. Puis les trajectoires sont superposées (Figure 51). Nous mesurons enfin le temps qu'il faut attendre pour que la distribution soit stationnaire. En pratique (Figure 79), nos observations nous ont conduit à garder les trajectoires qui durent plus de 200 s ; il s'agit d'un temps suffisant pour permettre aux billes qui tombent près des lignes de nucléation d'arriver au centre du réseau sous l'effet de l'activité motrice des moteurs moléculaires qui les transportent.

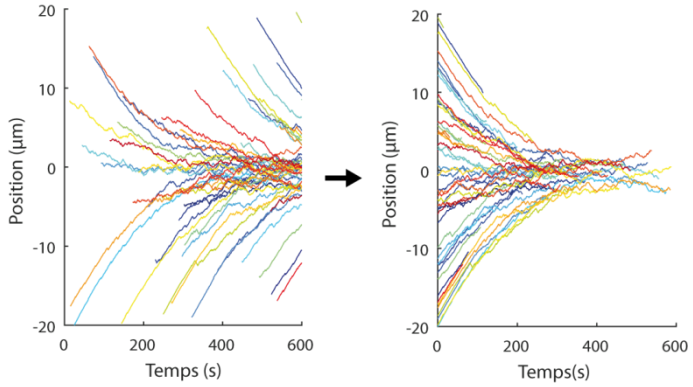


Figure 51 : Correction de l'apparition différée des billes dans le plan d'observation pour mesurer la distribution stationnaire de position (Simulation d'un processus de transport bruité vers le centre du réseau ; situé ici à la position 0 ; le modèle est détaillé au Chapitre IV). A gauche : données brutes. A droite : l'apparition des billes est ramenée à l'instant 0. La distribution des billes atteint un état stationnaire après un temps caractéristique d'environ 200s ; ce temps est similaire à celui observé expérimentalement pour un transport des billes-myosines II (Figure 79).

c. Analyse globale des trajectoires : mouvement quadratique moyen

Après détection de la position des billes au cours du temps et filtrage de ces trajectoires pour en extraire les parties mobiles (voir page 70), nous obtenons N_T trajectoires $\{\vec{r}_i(1), \vec{r}_i(2), \dots, \vec{r}_i(j), \dots, \vec{r}_i(N_i)\}$, où N_i représente le nombre de points de la $i^{ème}$ trajectoire et $\vec{r}_i(j)$ est le vecteur position au $j^{ème}$ point de la trajectoire dans le plan d'observation ($i=1,\dots,N_T$; $j=1,\dots,N_i$). Le temps $t=k\,\Delta t$ est échantillonné toutes les $\Delta t= 3$ s (k est un nombre entier). A partir de ces données, nous effectuons une analyse globale des mouvements en calculant une moyenne sur l'ensemble des billes sans distinguer leur position dans le réseau. Notons X_i la coordonnée du vecteur position sur l'un des axes du réseau. Nous commençons par calculer, pour une trajectoire i donnée, la moyenne du déplacement de la bille –notée $MD_i(t)$– pendant une durée t au cours de sa trajectoire :

$$MD_i(t) = \left[\sum_{l=1}^{N_i-k} \left(X_i(k+l) - X_i(l)\right)\right] \Big/ (N_i - k) \qquad \text{Eq. 17}$$

où $N_i>k$ pour assurer que la trajectoire ait une durée supérieure à t. Nous pouvons alors calculer le mouvement moyen (MD) et le mouvement quadratique moyen (MSD) de l'ensemble des billes en faisant une moyenne sur l'ensemble des N(t) trajectoires qui durent plus longtemps que la durée t :

$$MD(t) = \left[\sum_{l=1}^{N(t)} MD_i(t)\right] \Big/ N(t) \qquad \text{Eq. 18}$$

$$MSD(t) = \left[\sum_{l=1}^{N(t)} \left(MD_i(t)\right)^2\right] \Big/ N(t) \qquad \text{Eq. 19}$$

En pratique, nous effectuons cette analyse en projetant les trajectoires suivant l'axe des filaments d'actine (axe X) et perpendiculairement à cet axe (axe Y ; cet axe coïncide avec la direction des lignes de nucléation). Nous obtenons alors le MD et le MSD suivant chacun de ces deux axes.

Afin de discuter la signification de cette approche, considérons deux cas limites pour lesquels le déplacement moyen et le déplacement quadratique moyen s'expriment simplement. Le premier cas est celui du mouvement dirigé à une vitesse v uniforme et constante, pour lequel MD(t)=vt et MSD(t)=v^2t^2. Le deuxième cas est celui du mouvement diffusif avec un coefficient de diffusion D uniforme et constant, pour lequel MD(t)= 0 et MSD(t)=2Dt (diffusion à une dimension). Par conséquent, si la relation entre le mouvement quadratique moyen et le temps est tracée en échelle log-log, nous devons obtenir une droite de pente 2 pour le mouvement dirigé et une droite de pente 1 pour le mouvement diffusif (Figure 52 A et B). La relation MSD(t) fournit donc des informations qualitatives sur la nature physique d'un phénomène de transport. En général le transport n'est ni purement convectif ni purement diffusif ; la pente de la relation MSD(t) est comprise entre 1 et 2 et peut varier avec le temps. C'est le cas en particulier pour un mouvement confiné, comme quand une particule diffuse librement dans une boîte ou quand une bille est dans un piège optique : le MSD sature à temps long (Figure 52.C). Dans le cas d'un processus de transport complexe, il est possible de définir une vitesse et un coefficient de diffusion dépendant du temps en écrivant :

$$\mathrm{MD(t)} = \mathrm{v(t)} \times \mathrm{t} \qquad \text{Eq. 20}$$

$$\mathrm{MSD(t)} = \mathrm{v^2(t)} \times \mathrm{t^2} + 2\mathrm{D(t)} \times \mathrm{t} \qquad \text{Eq. 21}$$

Il est à noter que le nombre de trajectoires N(t), qui contribue aux moyennes d'ensemble, diminue avec la durée t utilisée pour calculer les relations MD(t) et le MSD(t). L'erreur sur la détermination du MD et du MSD croît donc avec la durée t. En supposant que la vitesse suit une loi normale, que la diffusion suit une loi de χ^2 centrée, que le MSD suit une loi de χ^2 non centrée, et que N>100, les écarts types $\mathrm{MD}/\sqrt{\mathrm{N}-1}$ et $\mathrm{MSD}\sqrt{2/[\mathrm{N}-1]}$ peuvent être calculés respectivement pour le MD et le MSD. Pour N<100, les erreurs sur la vitesse et la MD peuvent être estimées par la loi t de Student.

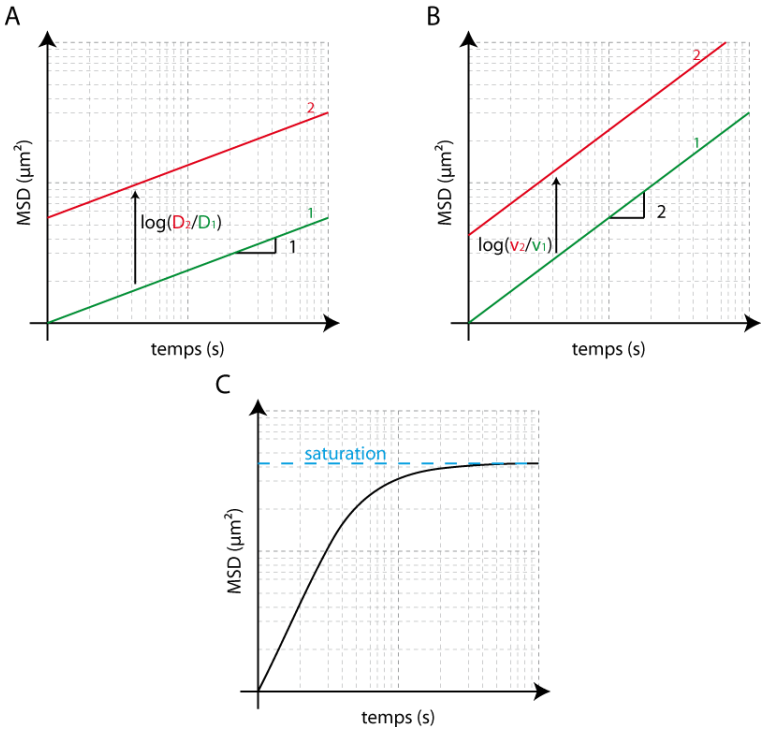


Figure 52 : MSD usuelles en fonction du temps en échelle logarithmique. A : Cas de deux billes diffusives de coefficients de diffusion différents. Leurs MSD sont proportionnelles au temps. En échelle logarithmique, les deux fonctions ont une pente de 1 et leur écart est lié au ratio des coefficients de diffusion associés. B : Cas de deux billes en translation rectiligne uniforme. Leurs MSD sont proportionnelles au carré du temps. En échelle logarithmique, les deux fonctions ont une pente de 2 et leur écart est lié au ratio des vitesses de déplacement associées. C : Cas d'une bille contrainte dans un espace confiné.

d. Analyse locale des trajectoires : profil de vitesse et de diffusion

Dans nos expériences, les billes interagissent avec un réseau d'actine dont la densité et la polarité sont inhomogènes (Figure 49, Figure 56). Nous pouvons nous attendre, et cela est observé, à ce que les propriétés du transport des billes dépendent de leur position dans le réseau. L'analyse globale, présentée au paragraphe précédent, masque ces inhomogénéités spatiales car elle présente une moyenne sur l'ensemble des trajectoires, sans distinction de la position des billes dans le réseau. Il est néanmoins possible de procéder à une analyse locale du déplacement moyen et du déplacement quadratique moyen des billes. Nous décrivons ici comment.

Etant donné une position x_0 dans le réseau, nous détectons les billes dont les positions sont comprises entre x_0 et $x_0+\Delta x$, avec $\Delta x = 0{,}1$ µm, sur chaque image du film. Nous mesurons ensuite le déplacement moyen et le déplacement quadratique moyen de ces billes, en regardant où elles se trouvent une durée τ après l'instant où elles ont été détectées dans la fenêtre d'observation. Nous calculons alors les moyennes d'ensemble :

$$MD(x_0) = \left[\sum_{i=1}^{N(x_0)} \left(x_i(t_i+\tau) - x_i(t_i)\right)\right] \Big/ N(x_0) \qquad \text{Eq. 22}$$

$$MSD(x_0) = \left[\sum_{i=1}^{N(x_0)} \left(x_i(t_i+\tau) - x_i(t_i)\right)^2\right] \Big/ N(x_0) \qquad \text{Eq. 23}$$

où $x_i(t_i)=x_0$ pour toutes les billes qui sont prisent en compte dans la moyenne, $N(x_0)$ est le nombre total de billes détectées et t_i représente le temps auquel la bille i a été détectée. La vitesse effective $V_{EFF}(x_0)$ et le coefficient de diffusion effective $D_{EFF}(x_0)$ des billes à la position x_0 sont alors donnés par les relations :

$$MD(x_0) = v(x_0) \times \tau \qquad \text{Eq. 24}$$

$$MSD(t) = V_{EFF}^2(x_0) \times \tau^2 + 2D_{EFF}(x_0) \times \tau \qquad \text{Eq. 25}$$

Les écarts types sur la vitesse et le coefficient de diffusion sont donnés respectivement par $V_{EFF}(x_0)/\sqrt{N(x_0)-1}$ et $D_{EFF}(x_0)\sqrt{2/[N(x_0)-1]}$. Les calculs du déplacement moyen et du déplacement quadratique moyen sont effectués suivant chacun des deux axes du mouvement (axes X et Y).

Pour que cette procédure ait un sens, il est nécessaire que les profils des vitesses $V_{EFF}(x_0)$ et de diffusion $D_{EFF}(x_0)$ obtenus ne dépendent pas (trop) du choix de la durée τ que nous avons utilisée pour les estimer. Pour cela, il faut que ces profils soient suffisamment doux pour que les variations de vitesse et de diffusion soient négligeables au cours du déplacement associé à la durée τ ; autrement dit, la durée τ doit être suffisamment faible. D'autre part, la durée τ ne doit pas être trop courte non plus pour que l'activité stochastique des billes conduise à une distribution gaussienne des déplacements de laquelle peut être extrait un coefficient de diffusion (théorème central limite). En pratique, nous avons choisi τ= 12 s (voir Annexe Figure 117).

L'estimation des coefficients de diffusion et de vitesse se fait à partir de l'histogramme des déplacements. En présence d'un bord à proximité de la zone étudiée, cet histogramme est tronqué ou déformé car le cargo ne peut pas traverser le bord (Figure 53). Dans nos expériences, les lignes de nucléation fournissent une barrière au mouvement des billes. Pour une ligne de bordure située à une position plus négative que celle de la région étudiée, l'estimation de la valeur moyenne des déplacements augmente et l'écart type diminue. Autrement dit, l'effet de bord conduit à une surestimation de la vitesse et à une sous-estimation du coefficient de diffusion. La portée de l'effet de bord dépend de l'écart type σ des déplacements. Pour une distribution gaussienne des déplacements, 99,99% d'entre eux sont compris entre $\pm 4\sigma$ du pic. Ainsi, le bord se fera sentir jusqu'à une distance de 4 σ (Figure 54).

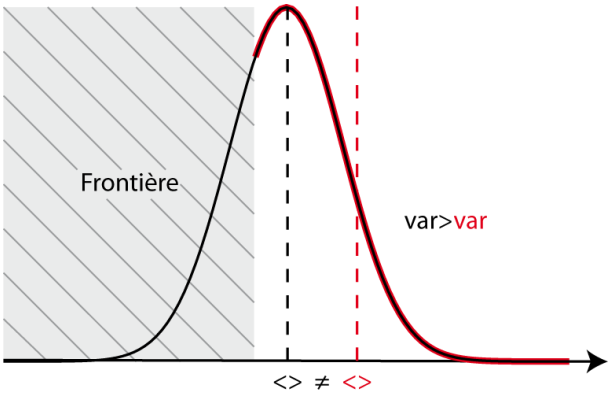


Figure 53 : Illustration de l'influence d'un bord sur l'histogramme des déplacements. En noir : fonction Gaussienne. En rouge : fonction Gaussienne tronquée.

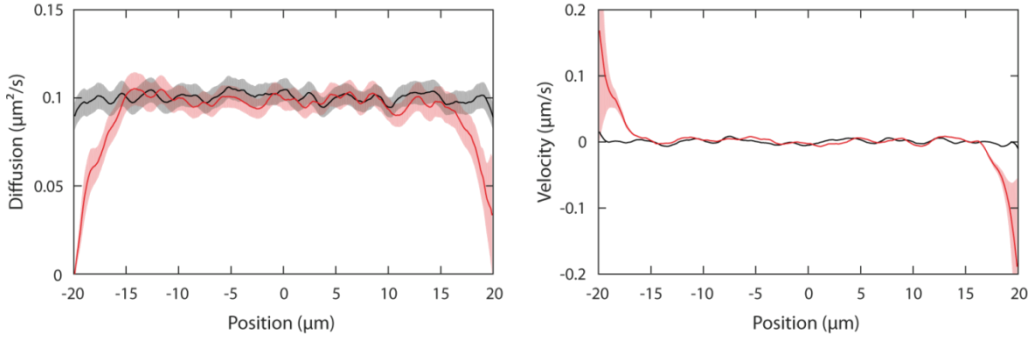


Figure 54 : Simulation des profils de vitesse et de diffusion en présence (rouge) ou en l'absence (noir) de bordures pour un processus de diffusion pure. Les bordures sont situées à ±20 µm. Le coefficient de diffusion est uniforme et fixé à 0,1 $\mu m^2.s^{-1}$; la vitesse est uniformément nulle

e. Distribution stationnaire de position pour un processus de convection-diffusion

Nous décrivons ici comment estimer la distribution stationnaire de position des billes à partir des profils de vitesse v(x) et du coefficient de diffusion D(x) décrits au paragraphe précédent. L'estimation présuppose que le transport des billes suit un processus de convection-diffusion. Dans un réseau antiparallèle, les moteurs moléculaires transportent activement les billes vers la ligne médiane d'un couple de lignes de nucléation, ce qui tend à accumuler les billes sur cette ligne ; la diffusion s'oppose à cette inhomogénéité. Nous notons P(x,t) la densité de probabilité de position des billes se trouvant à une position x à un temps t. La densité de flux des billes J(x, t) suivant l'axe X (axe des filaments d'actine) s'écrit comme la somme d'une contribution diffusive proportionnelle au gradient de P suivant x et d'une contribution convective proportionnelle à P :

$$J(x,t) = -D(x)\frac{\partial P(x,t)}{\partial x} + v(x)\,P(x,t), \qquad \text{Eq. 26}$$

avec l'équation de conservation :

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} + \frac{\partial J(x,t)}{\partial x} = 0. \qquad \text{Eq. 27}$$

Nous négligeons ici le terme de source correspondant à l'arrivée de billes nouvelles dans le plan d'observation qui résulte de la sédimentation des billes dans le volume de l'échantillon. A l'état stationnaire, le flux de billes doit être uniforme : $\partial P/\partial t = 0 \Rightarrow \partial J/\partial x = 0$. De plus, si les billes évoluent dans un réseau d'actine antiparallèle, le système présente une symétrie miroir par rapport à la ligne médiane d'un couple de lignes de nucléation. Ainsi, le flux doit être uniformément nul : J= 0. La densité de probabilité de présence $P=P_{SS}$ à l'état stationnaire obéit donc à l'équation :

$$0 = -D(x)\frac{\partial P_{ss}}{\partial x}(x) + v(x)P_{ss}(x) \qquad \text{Eq. 28}$$

dont la solution s'écrit :

$$P_{ss}(x) = P_{ss_0} \exp\left(\int_0^x \frac{v(x')}{D(x')} dx'\right) \qquad \text{Eq. 29}$$

où P_{ss_0} est la probabilité de présence de billes en x= 0.

La distribution calculée à partir des profils de vitesse et de diffusion peut être comparée à celle estimée directement à partir du relevé de positions des billes qui ont des trajectoires suffisamment longues pour que les billes aient eu le temps de s'équilibrer avec le réseau (voir page 71). La méthode directe est parfois imprécise car le nombre de billes suffisamment 'âgées' pour contribuer à la distribution stationnaire peut être relativement faible. Par contre, toutes les billes, 'jeunes' et 'âgées', contribuent à la mesure des profils de vitesse et de diffusion, et donc à l'estimation de la distribution stationnaire, par un processus de convection-diffusion. Cette estimation est donc plus fiable. Expérimentalement, il se trouve que l'accord entre les deux types de distributions est très bon, ce qui justifie à postériori que le transport des billes peut être décrit par un processus de convection-diffusion effectif (Figure 82).

Chapitre III

Transport et positionnement de billes cargos dans un réseau antiparallèle d'actine

Dans ce chapitre, nous décrirons les mouvements qui sont observés lorsque des billes couvertes de myosines sont placées dans un réseau antiparallèle de filaments d'actine. Le réseau est obtenu à partir d'un motif de lignes parallèles et fonctionnalisées par un 'Nucleation Promoting Factor' (pWA), qui active la nucléation de la polymérisation de l'actine. Les billes peuvent interagir avec des filaments de polarité contraire, avec une probabilité qui dépend de chaque type de filaments, et donc de l'endroit où se trouvent les billes dans le réseau. Cette condition peut en principe contrarier le transport dirigé dans une direction, conduire à l'arrêt des billes ou à du mouvement bidirectionnel. Nous recherchons les paramètres physiques qui déterminent le transport de cargos dans ces conditions adverses. En particulier, nous étudions l'influence de l'architecture du réseau d'actine ainsi que celle de la nature du moteur moléculaire utilisé (myosine-II, myosine-VI ou myosine-V) sur les propriétés du transport. Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord présenter la structure du réseau de filaments d'actine utilisé ainsi que sa dynamique. Par la suite, nous allons décrire le comportement des billes passives (sans moteur) dans ces réseaux afin de pouvoir, dans une autre section, comprendre le comportement des billes actives. Une modélisation du système est proposée dans une dernière partie.

A Le réseau de filaments d'actine *in vitro*

Pour notre étude, le motif sélectionné est constitué d'un ensemble de plusieurs lignes parallèles longues de 5 cm et larges de 3, 6 ou 9 µm. Ce motif permet de définir quatre régions différentes. Sur les lignes de nucléation, le réseau est branché. Entre les lignes, le réseau est antiparallèle. Au niveau de la ligne de bordure (la ligne de droite sur la Figure 55), qui n'a qu'une seule ligne voisine d'un côté, un réseau parallèle émerge de l'autre côté de ce motif de bordure de nucléation. Enfin, loin de la ligne de bordure, il n'y a pas d'actine. Cette ligne nous a été très utile car elle nous permet de mesurer la longueur des filaments. Nous nous sommes donnés un repère orthonormé tel, que l'axe X est orienté perpendiculairement aux lignes de nucléation, et donc parallèlement aux filaments d'actine qui en émergent (Figure 55).

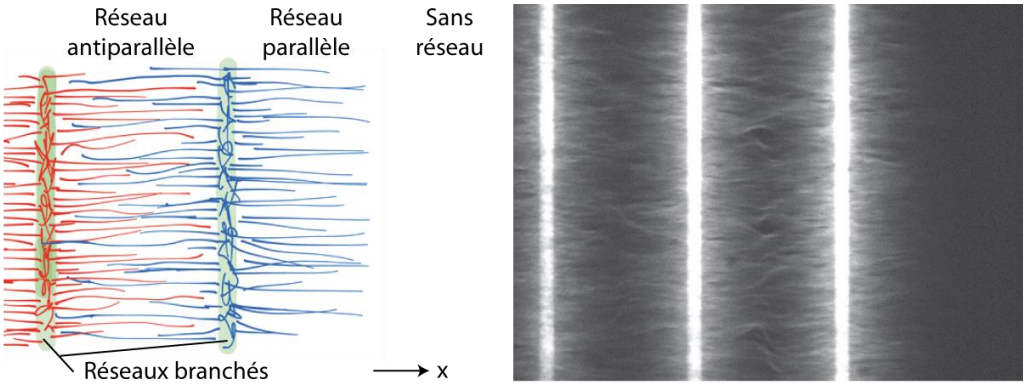


Figure 55 : Des lignes parallèles de nucléation aux réseaux de filaments d'actine 1D. A gauche : description schématique des réseaux de filaments d'actine (rouge et bleu) obtenus à partir de deux lignes de pWA (vert). A droite : visualisation, après 30 minutes et en fluorescence au microscope confocal à disque rotatif, du réseau de filaments d'actine polymérisés à partir de trois lignes de nucléation larges de 3 µm et espacées de 40 µm. Nous considérons que le réseau présente une invariance par translation suivant l'axe Y.

1. Structure et dynamique des réseaux

a. Structure des réseaux

A partir de l'image de fluorescence du réseau, nous avons mesuré le profil d'intensité lumineuse suivant l'axe X (voir page 68). Le profil est moyenné sur plusieurs périodes du motif (repliement) et aussi suivant l'axe Y. Après trente minutes de polymérisation, le profil $\rho(x)$ présente un pic qui couvre la ligne de nucléation (x= 0 ; réseau branché), puis décroît exponentiellement (réseau parallèle) (Figure 56.A). Le profil exponentiel $\rho_{\|}$ du réseau parallèle est entièrement décrit par deux paramètres : la densité maximale ρ_0 et la longueur caractéristique λ qui n'est autre que la longueur moyenne des filaments (Eq. 30).

$$\forall x \in [\,0\,;\,+\infty\,[\ :\qquad \rho_{\|}(x) = \rho_0\, e^{-\frac{x}{\lambda}}$$
$$\lambda = \int_0^{+\infty} x\,\rho_0\, e^{-\frac{x}{\lambda}}\,dx \Big/ \int_0^{+\infty} \rho_0\, e^{-\frac{x}{\lambda}}\,dx \qquad \text{Eq. 30}$$

En supposant que le profil d'intensité de fluorescence reflète fidèlement la densité des filaments d'actine dans le réseau, cette longueur représente la longueur moyenne des filaments d'actine (Eq. 30). Un ajustement exponentiel sur le profil mesuré après 30 minutes de polymérisation conduit à λ= 8,2 µm ± 1,1 µm (n= 29). Il est également possible de mesurer l'élongation maximale des filaments visibles en fluorescence (Reymann et al. 2010). Un inconvénient de cette mesure est qu'elle dépend de la valeur du bruit de fond, qui peut varier de l'image d'un échantillon à un autre et selon la sensibilité de la caméra utilisée.

Nous avons observé que le profil d'intensité lumineuse $\rho_{||\pm}(x)$ mesuré entre deux lignes de nucléation espacées d'une distance L>20 µm, où le réseau est antiparallèle, présente une symétrie miroir par rapport à la ligne médiane du couple de

lignes de nucléation. Le profil est décrit par la somme de deux profils exponentiels identiques se faisant face (Figure 56.B) (Eq. 31).

$$\rho_{||\pm}(x) = \rho_{\|}\left(x + \frac{L}{2}\right) + \rho_{\|}\left(-x + \frac{L}{2}\right) = 2\,\rho_0\, e^{-\frac{L}{2\lambda}} \cosh\left(\frac{x}{\lambda}\right) \qquad \text{Eq. 31}$$

où l'origine des abscisses, définie comme le centre du réseau, est positionnée à égale distance des deux lignes et les paramètres λ et ρ_0 sont les mêmes que ceux mesurés à partir du réseau parallèle émergeant de la ligne frontière du motif.

Ce 'principe de superposition' suggère que la polymérisation à partir d'une ligne de nucléation est indépendante de ses voisines. Une telle propriété n'était pas évidente puisque les filaments provenant d'une ligne voisine peuvent être suffisamment longs pour atteindre la zone de nucléation et ainsi nucléer de nouveaux filaments (Letort et al. 2015). D'ailleurs, pour $L<2\,\lambda$ (ici ~16 µm), nous n'observons plus de profils obéissant aussi clairement à l'Eq. 31.

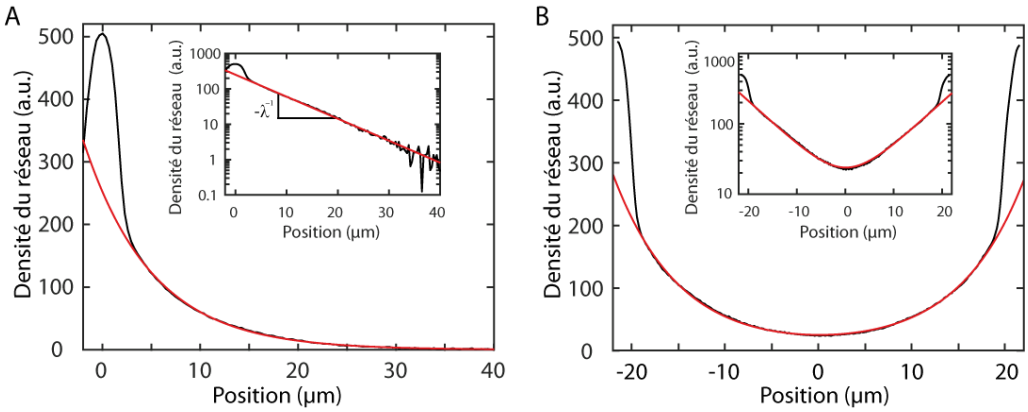


Figure 56 : Profil des réseaux parallèles et antiparallèles après 30 minutes de polymérisation. A : Le réseau parallèle (noir) et un ajustement par une exponentielle décroissante (rouge). La ligne de nucléation a une largeur de 3 µm et l'origine des abscisses x est placée en son centre. B : Le réseau antiparallèle (noir) et son approximation en considérant la nucléation du réseau indépendante entre les lignes (rouge). Cette approximation est la somme de deux exponentielles identiques à celle représentée en A et se faisant face (principe de superposition). Le motif est constitué de lignes larges de 3 µm et espacées de 40 µm. La ligne de bordure du motif a été utilisée pour mesurer le profil tracé en A et pour ajuster le profil du réseau antiparallèle mesuré entre deux lignes de nucléation. Paramètres : $\lambda = 7$ µm et $\rho_0 = 200$ a.u..

Les profils exponentiels de nos réseaux sont entièrement décrits par la longueur caractéristique λ et la densité ρ_0. Nous avons cherché à faire varier ces deux paramètres en jouant sur la concentration d'actine monomérique initiale, la largeur des lignes, l'espacement entre les lignes et la quantité du nucléateur (complexe Arp2/3) mis en solution (Figure 58). Cela a conduit à une observation surprenante. Lorsque la concentration d'actine de 2 à 6 µM augmente, la densité du réseau de filaments (Figure 58.A) ainsi que la longueur maximale des filaments (Figure 58.A) augmentent, comme nous aurions pu nous le prévoir (voir les observations précédentes du groupe de Laurent BLANCHOIN page 23, Reymann et al. 2010), cependant la longueur moyenne des filaments d'actine demeure constante. Ainsi, une augmentation de la densité correspond à la génération de filaments courts et longs de sorte que la longueur moyenne reste la même.

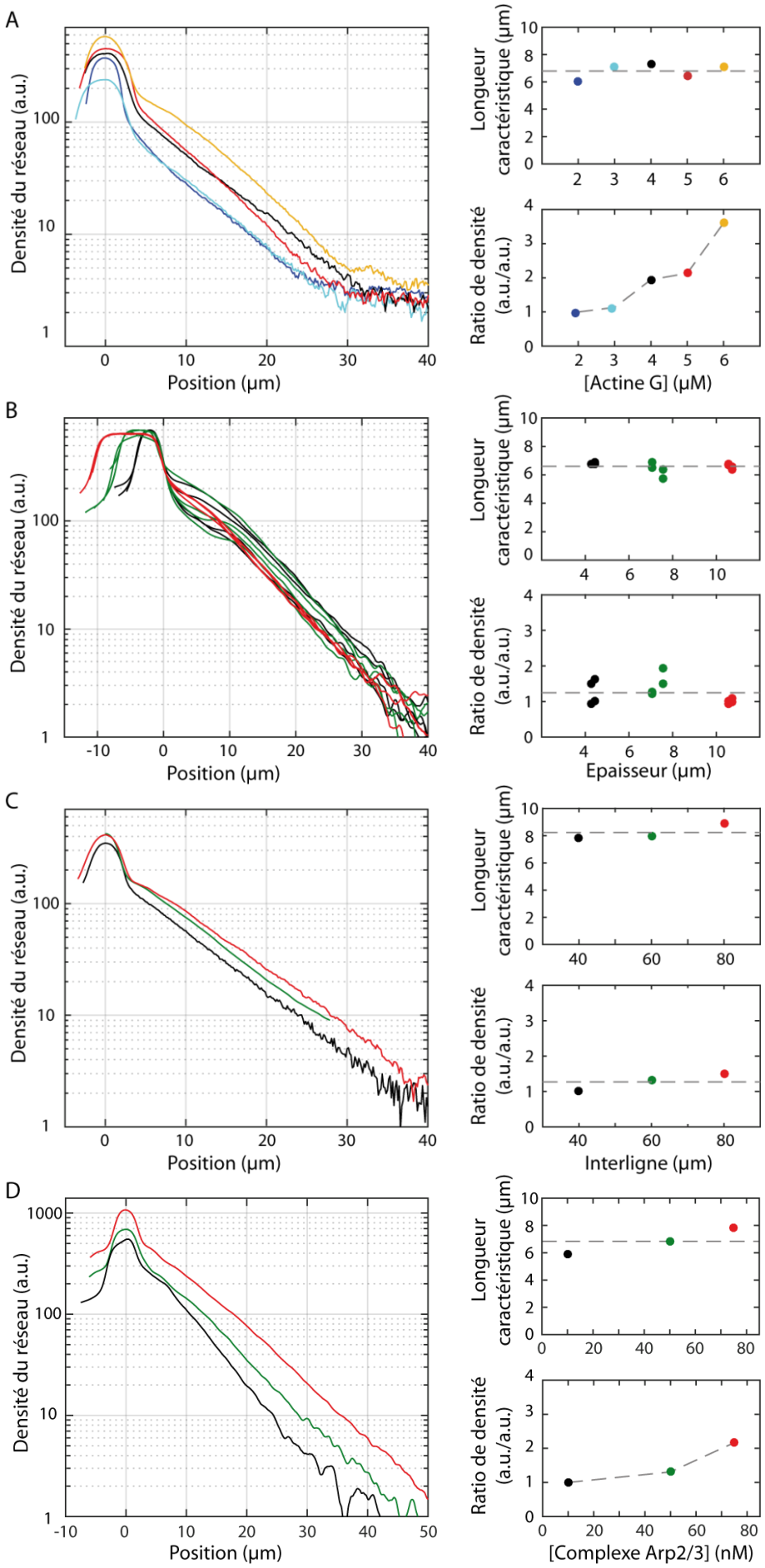

A
Densité du réseau (a.u.)
Position (µm)
Longueur caractéristique (µm)
Ratio de densité (a.u./a.u.)
[Actine G] (µM)
B
Densité du réseau (a.u.)
Position (µm)
Longueur caractéristique (µm)
Ratio de densité (a.u./a.u.)
Epaisseur (µm)
C
Densité du réseau (a.u.)
Position (µm)
Longueur caractéristique (µm)
Ratio de densité (a.u./a.u.)
Interligne (µm)
D
Densité du réseau (a.u.)
Position (µm)
Longueur caractéristique (µm)
Ratio de densité (a.u./a.u.)
[Complexe Arp2/3] (nM)

Figure 57 : Structure du réseau d'actine en fonction de (A) la concentration initiale de monomères d'actine mise en solution, de (B) la largeur de la ligne de nucléation, de (C) l'espacement entre les lignes de nucléation et de (D) la concentration du complexe Arp2/3. Sauf quand cela est indiqué, l'expérience se passe à 4 µM d'actine, 10 nM de complexes Arp2/3 et avec un motif constitué d'un ensemble de lignes de nucléation larges de 3 µm et espacées de 40 µm. La zone étudiée correspond au réseau parallèle généré par la ligne de bordure, en périphérie du motif. Dans chaque cas sont représentés le profil du réseau mesuré après 30 minutes de polymérisation (gauche), la longueur caractéristique du réseau (en haut à droite), la densité du réseau mesurée à 10 µm du centre de la ligne de nucléation (abscisse x= 10 µm) et normalisée par la valeur au premier point (en bas à droite).

La structure du réseau d'actine ne dépend pas de la largeur des lignes dans une gamme allant de 4 à 10 µm. De même, la valeur de l'interligne dans une gamme de 40 à 80 µm n'influence pas la longueur moyenne des filaments. En revanche, la densité du réseau pourrait augmenter très légèrement avec l'interligne (Figure 57.C). En effet, le changement de l'interligne fait varier le pourcentage de surface occupée par l'agent de nucléation (pWA). Ainsi, la quantité de monomères disponibles pour chaque ligne de nucléation change : plus l'interligne est grand, moins il y a de lignes sur le motif, et donc plus la concentration effective de monomères par ligne est importante. Comme la concentration d'actine contrôle la densité du réseau (Figure 57.A), nous nous attendons alors à avoir un réseau plus dense lorsque l'interligne augmente, comme observé (Figure 58.B).

Enfin, augmenter la concentration du complexe Arp2/3 en solution de 10 à 75 nM permet d'obtenir des réseaux plus denses (Figure 57.D). Au vu de la variabilité des longueurs caractéristiques mesurées dans les profils exponentiels, la longueur moyenne des filaments d'actine ne semble pas dépendre de manière significative de la concentration du complexe Arp2/3. L'augmentation de la densité du réseau conduit cependant à une augmentation des élongations maximales observables (i.e. : longueur des filaments à une densité donnée) (Figure 58.C), en contradiction avec une observation de la littérature (Figure 16). En d'autres termes, il y a plus de filaments longs lorsque la concentration du complexe Arp2/3 augmente, mais il y a aussi plus de filaments courts de sorte que la longueur moyenne est inchangée.

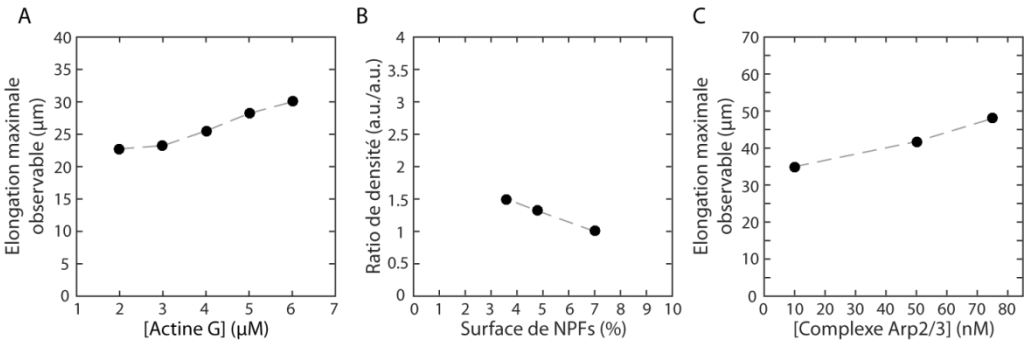


Figure 58 : Dépendance de la structure du réseau en fonction de divers paramètres. Valeurs déduites des données de la Figure 57. A : Elongation maximale observable des filaments en fonction de la concentration initiale de monomères d'actine en solution (Niveau de bruit 5 a.u.). B : Densité du réseau de filaments d'actine mesurée à l'abscisse x= 10 µm en fonction du pourcentage de surface recouverte par l'agent de nucléation (pWA). C : Elongation maximale observable des filaments en fonction de la concentration du complexe Arp2/3 (Niveau de bruit 2 a.u.).

b. Dynamique de polymérisation

Au-delà de la structure du réseau à un instant donné, il est également important de connaître son évolution au cours du temps. Dans une expérience de transport de billes par la myosine (voir plus loin), nous observons les mouvements des billes entre t= 10 min et t= 30 min après le début de la polymérisation (injection des produits dans la chambre expérimentale). Le réseau est-il stationnaire dans cette fenêtre temporelle ? La sensibilité du réseau de filaments d'actine à l'illumination oblige à réduire au maximum les temps d'exposition, du moins si nous voulons que la mesure soit conforme à la structure du réseau (voir page 66 et page 140). Ainsi, un cliché est pris au début et à la fin de chaque expérience, soit à la 10ième et à la 30ième minute de polymérisation. Les profils exponentiels obtenus montrent une augmentation significative de la densité du réseau (Figure 59.A). Ainsi, à 10 µm du centre de la ligne de nucléation, la densité augmente en moyenne de 90% ± 40% avec des extrema de 10 et 180% (n= 21). Quant à la longueur moyenne du réseau, elle croît légèrement de 7,1 µm ± 1,1 µm à 8,2 µm ± 1,3 µm (n= 21) (Figure 59.B).

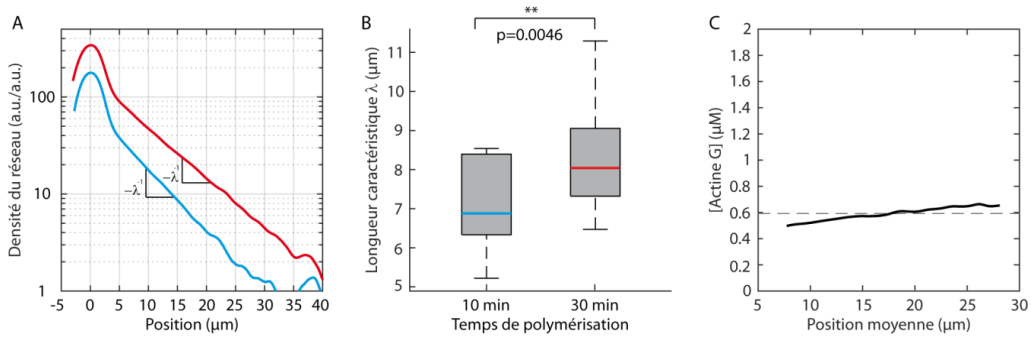


Figure 59 : Evolution du réseau parallèle entre la 10ième et la 30ième minute de polymérisation. Le réseau est construit à partir d'une ligne de 3 µm de largeur. Son centre définit l'origine des abscisses. A : Exemple type de l'évolution du profil entre la 10ième minute (bleu) et la 30ième (rouge). B : Distribution des longueurs moyennes des filaments d'actine, correspondant à la longueur caractéristique λ du profil exponentiel, pour ces deux instants (n= 21). Les rectangles gris représentent les données entre le 25ième et le 75ième centile. Les barres en pointillé délimitent les extrema des données. Les valeurs médianes sont indiquées en bleu ou en rouge. Les longueurs caractéristiques sont statistiquement différentes. Par la méthode de Welch, le test-t-student bilatéral donne en effet une valeur-p de 0,0046. C : Estimation de la concentration d'actine monomérique moyenne entre ces deux instants en fonction de la position où il est estimé. Comparée à sa valeur initiale (4 µM), la concentration d'actine a grandement diminué, mais il demeure néanmoins 15% des monomères encore disponibles dans la solution et la concentration en actine est supérieure à la concentration critique.

En mesurant l'évolution temporelle ($t_1 \rightarrow t_2$) de la position ($X_1 \rightarrow X_2$) à laquelle le réseau atteint une densité donnée, il est possible d'estimer une vitesse de polymérisation moyenne dans cette région (intervalle [X_1, X_2]), et donc une concentration en actine monomérique (voir page 11).

$$[\text{Actine}_G] = \frac{1}{k_{on}} \left(\frac{1}{a} \left(\frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \right) + k_{off} \right) \qquad \text{Eq. 32}$$

où a= 2,77 nm représente l'allongement du filament par ajout d'un monomère et où k_{on}= 8 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ et k_{off}= 2 s^{-1} sont respectivement les taux d'association et de dissociation des monomères en présence de profiline.

Dans le cas de profils exponentiels de longueurs constantes, cette concentration ne dépend pas de la position où elle est estimée. Au vu des faibles variations des longueurs caractéristiques (<15%), il est possible de considérer que c'est le cas de nos expériences (Figure 59.C). Nous prenons arbitrairement X_1=10 µm. Les deux clichés des réseaux parallèles révèlent une vitesse moyenne de polymérisation de 260 $nm.min^{-1}$ ± 15 $nm.min^{-1}$ et une concentration d'actine monomérique de 0,45 µM ± 9 nM (n= 21). Cette concentration est supérieure à la concentration critique (C_c ≈ 0,25 µM).

A ce stade, nos données ne sont pas suffisantes pour décrire en détail la cinétique de polymérisation du réseau parallèle. Augmenter le nombre de clichés perturbe la structure de l'actine mais cela reste le moyen le plus simple pour essayer de saisir le processus de stabilisation de la structure du réseau. Dans quelques expériences, nous avons donc imagé le réseau toutes les 5min entre la 10ième et la 30ième minute de polymérisation. Ces expériences confirment (Figure 60) que la longueur caractéristique est quasi-constante dans la fenêtre d'observation alors que la densité d'actine peut doubler. La vitesse d'élongation et la concentration effective de monomères d'actine sont quasi constantes dans cet intervalle de temps. Ces valeurs sont respectivement de 340 nm/s et 0,5 µM (>C_c).

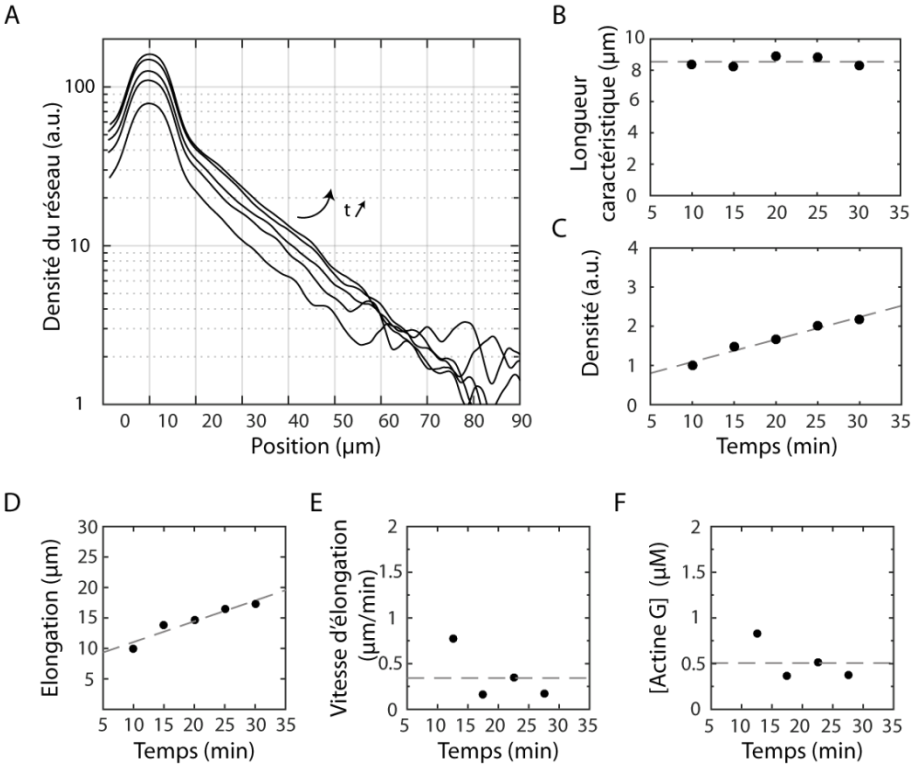


Figure 60 : Dynamique de polymérisation d'un réseau parallèle. Le réseau est obtenu à partir d'une ligne de nucléation large de 3 µm dont le centre définit l'origine des abscisses. A : Profil du réseau mesuré toutes les cinq minutes. B : Longueurs caractéristiques du réseau (noir) en fonction du temps et sa moyenne (gris). C : Densité du réseau (noir) mesurée à une abscisse de 10 µm en fonction du temps ; la relation est décrite par

une régression linéaire (gris). D : Elongation des filaments pour une densité de 10 a.u. en fonction du temps et sa régression linéaire (gris). E : Vitesse d'élongation en fonction du temps. F : Concentration effective de monomères d'actine en fonction du temps (calculée à partir de l'Eq. 32).

2. Modélisation de la polymérisation

Nous avons cherché à comprendre l'origine physique du profil exponentiel de densité d'un réseau parallèle de filaments d'actine formé à partir d'une ligne de nucléation et aussi comment le réseau peut gagner en densité au cours du temps tout en conservant à peu près constante la longueur moyenne des filaments qui le composent. Nous avons pour cela travaillé en collaboration avec Frank JÜLICHER (MPIPKS), Jean-François JOANNY (ESPCI / UMR168) et Carles BLANCH MERCADER (post-doctorant de l'UMR 168).

L'objectif de notre approche est de comprendre le phénomène par un modèle de polymérisation simple. Ainsi, nous ne différencions pas l'état du nucléotide associé à l'actine pour ne prendre en compte que la forme majoritaire, c'est-à-dire l'actine-ATP, et les constantes cinétiques qui lui sont associées. De plus, notre modèle est réduit à une dimension de l'espace, l'axe de croissance des filaments d'actine. Dans le même état d'esprit, seule nous intéresse la dynamique du réseau parallèle. La dynamique de nucléation sur la surface est décrite par un seul paramètre, le taux de génération $k_N(t)$ de nouveaux filaments à l'intersection entre les deux types de réseaux (branché et parallèle). Cette jonction définit l'origine des abscisses x= 0 ; les bouts barbés des filaments sont dirigés vers les abscisses positives.

a. Dynamique de nucléation-élongation

La polymérisation des filaments d'actine en dehors des lignes de nucléation doit satisfaire une équation de conservation et une condition limite (Eq. 33).

$$\begin{cases} \forall x \in \mathbb{R}_+^* : \ \partial_t \rho_B(x,t) = -v\, \partial_x \rho_B(x,t) + D\, \partial_x^2 \rho_B(x,t) \\ \partial_t \rho_B(0,t) = -v\, \partial_x \rho_B(0,t) + D\, \partial_x^2 \rho_B(0,t) + k_N(t) \end{cases} \qquad \text{Eq. 33}$$

où $\rho_B(x,t)$ est la densité linéique de bouts barbés à l'abscisse x et au temps t. La constante v correspond à la vitesse d'élongation du filament et D est le coefficient de diffusion d'élongation du filament dû à la stochasticité d'association et de dissociation de monomères au bout barbé des filaments. Il est possible d'exprimer les coefficients v et D en fonction des taux d'association k_{on} et de dissociation k_{off} ainsi que de la taille utile 'a' d'un monomère d'actine dans l'élongation du filament (Eq. 34 et Eq. 35, voir Annexe page 159).

$$v = a\,(k_{on}[\mathrm{Actine_G}] - k_{off}) \qquad \text{Eq. 34}$$

$$D = a^2\,(k_{on}[\mathrm{Actine_G}] + k_{off}) \qquad \text{Eq. 35}$$

Comme chaque filament polymérise dans le sens des x>0 à partir de l'origine (x= 0), le nombre de filaments N_f en une position x n'est autre que le nombre de filaments dont l'extrémité (bout barbé) se trouve entre l'abscisse x et l'infini.

$$N_f(x,t) = \int_x^{+\infty} \rho_B(u,t)\, du \qquad \text{Eq. 36}$$

Dans un premier temps, nous considérons que le taux de création de nouveaux bouts sur la ligne de nucléation est constant ($k_N(t)=k_N$). De plus, nous choisissons une concentration d'actine constante et égale à 4 µM, comme au début d'une expérience.

Une simulation de cette dynamique montre que le réseau devient plus dense au court du temps mais que les profils ne sont pas exponentiels : la longueur caractéristique $l(x)= \rho(x)/\rho'(x)$, obtenue en prenant l'inverse de la dérivée logarithmique du profil de densité $\rho(x)$, n'est pas uniforme même sur une zone restreinte de positions x (Figure 61.A, C et D). De plus, cette longueur caractéristique (mesurée en x= 0) ne se stabilise jamais au court du temps ; elle ne cesse d'augmenter (Figure 61.B).

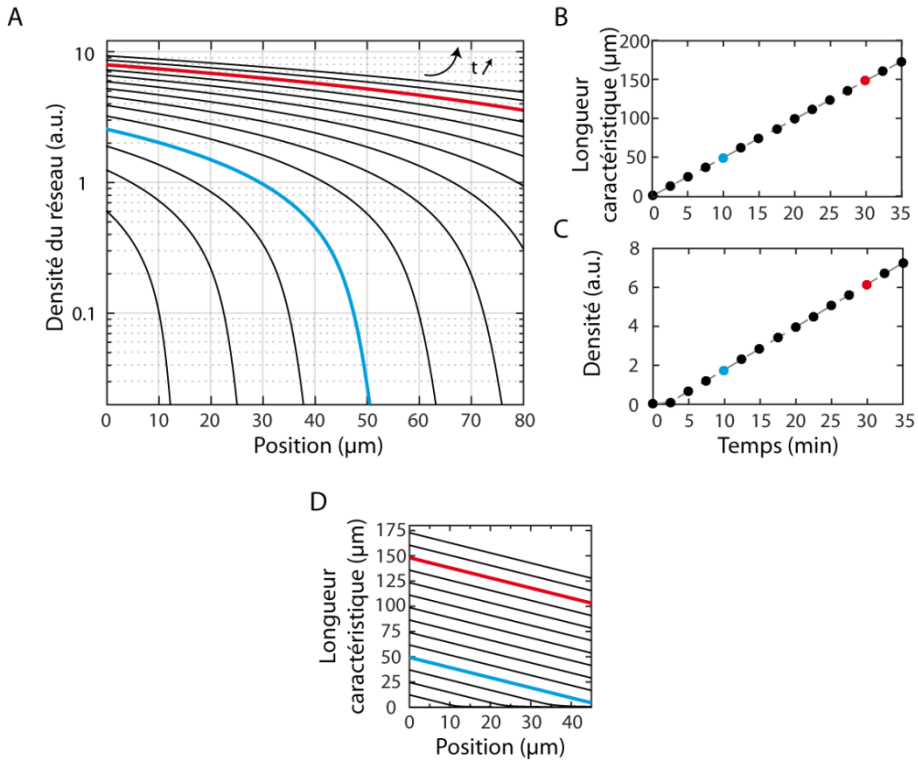


Figure 61 : Simulation de la polymérisation d'un réseau parallèle à partir des équations Eq. 33 (Concentration d'actine monomérique constante). A : Profil de densité du réseau calculés toutes les 150 secondes entre t= 2 min 30 s et t= 35 min. B : Evolution temporelle de la longueur caractéristique du réseau, définie comme l'inverse de la dérivée logarithmique du profil à l'origine (x= 0). C : Evolution temporelle de la densité du réseau à la position x= 10 µm. D : Longueur caractéristique en fonction de la position à laquelle elle est estimée et calculée aux mêmes instants qu'en A. Bleu : t= 10 min. Rouge : t= 30 min. Le taux d'apparition de nouveaux bouts sur la ligne de nucléation (x= 0) est constant. La concentration en monomères d'actine est constante et égale à 4 µM. Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} sont imposées respectivement à 8 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ et 2 s^{-1}.

Ce modèle très simple de nucléation-élongation des filaments d'actine est donc insuffisant pour expliquer nos profils. Nous avons alors pris en compte la consommation des monomères d'actine tout en supposant que leur concentration demeure uniforme dans l'espace (la diffusion des monomères d'actine est supposée rapide). Sur la ligne de nucléation, de nouveaux bouts barbés ne peuvent apparaître que si la concentration en monomères est supérieure à la concentration critique. Dans une approximation du premier ordre, nous avons considéré que le taux de production de nouveaux bouts barbés (k_N) est proportionnel à la différence entre la concentration de monomères d'actine et la concentration critique, et donc à la vitesse d'élongation (Eq. 34).

Une simulation de cette nouvelle dynamique ne produit toujours pas de profil exponentiel, puisque la dérivée logarithmique du profil, dont l'inverse définit la longueur caractéristique, n'est jamais uniforme (Figure 62.A et D). La longueur caractéristique maximale, obtenue en x= 0, se stabilise bien à une valeur constante. Cependant, entre la 10ième et la 30ième minute de polymérisation, cette longueur augmente de manière similaire à la densité du réseau qui est mesurée à x= 10 µm (28% comparé à 40%) (Figure 62.B et C) ; ce comportement est contraire aux observations expérimentales. Comme nous nous y attendions, la densité du réseau croît avec la concentration en actine monomérique injectée (Figure 62.F), mais la longueur caractéristique en fait de même, alors qu'elle demeure constante dans les expériences (Figure 62.E). Le modèle est donc toujours insuffisant.

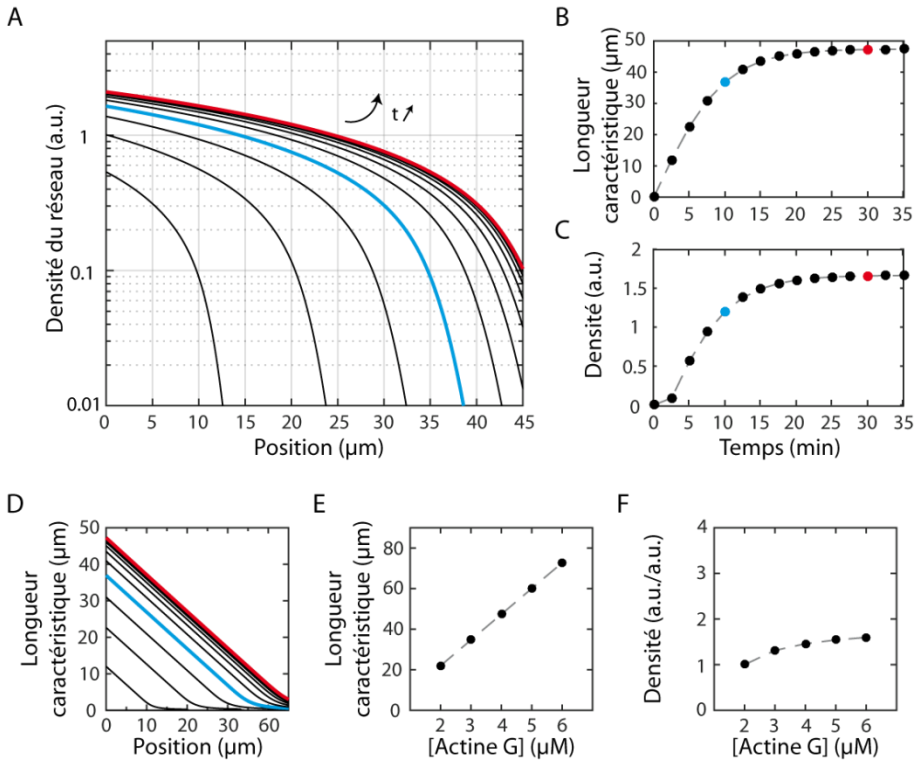


Figure 62 : Simulation de la polymérisation d'un réseau parallèle à partir les équations Eq. 33, en prenant en compte la consommation en monomères d'actine (la concentration diminue au cours du temps). A : Profil du réseau calculé toutes les 150 secondes entre t= 2 min 30 s et t= 35 min ; échelle semi-logarithmique. B : Evolution temporelle de la longueur caractéristique du réseau, définie comme l'inverse de la dérivée logarithmique du profil à l'origine (x= 0). C : Evolution temporelle de la

densité du réseau estimée à l'abscisse x= 10 µm. D : Longueur caractéristique en fonction de la position à laquelle elle est estimée et calculée aux mêmes instants qu'en A. E : Longueur caractéristique maximale des profils (correspondant à la pente minimale sur le profil rouge tracé en A) après 30 min de polymérisation en fonction de la concentration d'actine monomérique injectée au départ. F : Densité à la position x= 10 µm après 30 min de polymérisation en fonction de la concentration d'actine monomérique injectée au départ. Bleu : t= 10 min. Rouge : t= 30 min. Le taux d'apparition de nouveaux bouts sur la ligne de nucléation (x= 0) à un instant t est proportionnel à l'écart entre la concentration en actine monomérique disponible à cet instant et la concentration critique. La concentration en monomères d'actine est de 4 µM en début de simulation. Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} sont respectivement de 8 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ et 2 s^{-1}.

b. Nucléation-élongation en présence d'un processus rare de coiffe des bouts barbés

Pour expliquer nos observations expérimentales, il est nécessaire de complexifier encore plus le modèle de nucléation-élongation des filaments d'actine. Cela peut être fait de deux manières : soit en changeant la dynamique de nucléation-croissance du réseau branché, soit en changeant la dynamique de croissance du réseau parallèle. Nous avons considéré le deuxième cas de figure. Nous avons développé un modèle incluant un mécanisme de blocage (ou 'coiffe') de la dynamique du bout barbé d'un filament d'actine. Il existe alors deux catégories de bouts : les bouts dynamiques et les bouts stabilisés, avec des densités linéiques respectives notées ρ_B et ρ_{Bc}. Ils obéissent à une dynamique décrite par l'Eq. 37, où il apparaît un nouveau paramètre, k_c, qui représente le taux de coiffe des bouts barbés des filaments. Les autres paramètres sont identiques à ceux utilisés plus haut (Eq. 34 et Eq. 35).

$$\begin{cases} \partial_t \rho_B(0,t) = -v\, \partial_x \rho_B(0,t) + D\, \partial_x^2 \rho_B(0,t) - k_c\, \rho_{Bc}(0,t) + k_N(t) \\ \forall x \in \mathbb{R}_+^* : \ \partial_t \rho_B(x,t) = -v\, \partial_x \rho_B(x,t) + D\, \partial_x^2 \rho_B(x,t) - k_c\, \rho_{Bc}(x,t) \\ \partial_t \rho_{Bc}(x,t) = k_c\, \rho_B(x,t) \end{cases} \qquad \text{Eq. 37}$$

Le nombre de filaments est maintenant donné par l'Eq. 38.

$$N_f(x,t) = \int_x^{+\infty} [\rho_B(u,t) + \rho_{Bc}(u,t)]\, du \qquad \text{Eq. 38}$$

Dans un premier temps, nous considérerons le cas plus simple où la concentration de monomères d'actine en solution est constante. De même, nous supposerons que le nombre de bouts sur la ligne est constant ($\rho_B(0,t)=\rho_{B0}$). Dans ces conditions, la densité de bouts actifs atteint un état stationnaire ($\partial_t \rho_B(x,t) = 0$) et la densité de bouts bloqués croît linéairement avec le temps, comme le nombre de filaments (voir Annexe page 161), selon :

$$\overline{\rho}_B(x) = \rho_{B0}\, e^{-\frac{x}{l_0}} \qquad \text{Eq. 39}$$

$$\overline{\rho}_{Bc}(x,t) = \rho_{B0}\, k_c t\, e^{-\frac{x}{l_0}} \qquad \text{Eq. 40}$$

$$\overline{N}_f(x,t) = \rho_{B0}\, l_0\, (1 + k_c\, t) e^{-\frac{x}{l_0}} \qquad \text{Eq. 41}$$

Avec l_0 :

$$l_0 = \frac{2D}{-v + \sqrt{4k_c D + v^2}} \qquad \text{Eq. 42}$$

Le réseau présente donc un profil de densité exponentiel avec une longueur moyenne de filaments l_0. Le taux de coiffe des bouts barbés k_c peut s'exprimer en fonction de cette longueur et des coefficients v et D (Eq. 43). La solution indique que pour chaque nouveau bout actif qui apparaît sur la ligne de nucléation, il existe un bout qui se bloque. Ainsi, la population de bouts dynamiques est constante tandis que la population de bouts coiffés augmente linéairement avec le temps.

Dans nos expériences (l_0=λ), l_0 ne dépend pas de la concentration en monomères d'actine initiale présente en solution. Cela implique que k_c dépend également de la concentration d'actine (Eq. 43). Il est en effet possible écrire :

$$k_c = \frac{1}{\lambda}\left(\frac{D}{\lambda} + v\right) = \frac{a}{\lambda}\left(\left(\frac{a}{\lambda} + 1\right) k_{on}[\text{Actine}_G] + \left(\frac{a}{\lambda} - 1\right) k_{off}\right) \qquad \text{Eq. 43}$$

Il est à noter que le terme associé à la diffusion des bouts (D) est négligeable lorsque la concentration d'actine est très supérieure à la concentration critique (Eq. 44), ce qui est expérimentalement le cas pendant la majeure partie du processus de polymérisation (Figure 59.C et Figure 60.F). La diffusion de longueur des filaments ne semble donc pas avoir une grande importance sur la polymérisation du réseau.

$$v \gg \frac{D}{\lambda} \quad \Leftrightarrow \quad [\text{Actine}_G] \gg \frac{k_{off}}{k_{on}} \frac{\lambda + a}{\lambda - a} \approx \frac{k_{off}}{k_{on}} \qquad \text{Eq. 44}$$

Dans cette limite, la longueur moyenne des filaments est alors simplement donnée par le produit de la vitesse d'élongation v par le temps moyen nécessaire pour coiffer un filament $1/k_c$:

$$\lambda \cong v/k_c\,, \qquad \text{Eq. 45}$$

Le taux de coiffe doit alors être à la concentration d'actine monomérique ; nous noterons k'_c le coefficient de proportionnalité (Eq. 46).

$$k_c = \frac{v}{\lambda} = \frac{a}{\lambda}(k_{on}[\text{Actine}_G] - k_{off}) \approx \frac{a\, k_{on}}{\lambda}[\text{Actine}_G] = k'_c\,[\text{Actine}_G] \qquad \text{Eq. 46}$$

En utilisant k_{on}= 8 $\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$, a= 2,77 nm et λ= 8,2 µm (la longueur moyenne des filaments mesurée dans nos expériences à t= 30 min), nous obtenons l'estimation $k'_c \approx 2{,}7\times10^{-3}$ $\mu M^{-1}.s^{-1}$. Pour une concentration en actine monomérique de 4 µM, le taux de coiffe est alors $k_c \approx 0{,}01$ s^{-1}, ce qui correspond à un évènement de coiffe toutes les 200 s. Pour des concentrations d'actine monomérique de quelques µM, le taux de coiffe k_c est de deux ordres de grandeur plus faible que les taux d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) des monomères. Le blocage du bout barbé d'un filament en croissance est donc un évènement rare.

Dans la limite où la diffusion est négligeable (Eq. 44, Eq. 47), la dynamique vers l'état stationnaire peut être résolue analytiquement (Eq. 48, voir Annexe page 161).

$$\begin{cases} \rho_B(0,t) = \rho_{B0} \\ \forall x \in \mathbb{R}_+^* : \ \partial_t \rho_B(x,t) = -v\, \partial_x \rho_B(x,t) - k_c\, \rho_{Bc}(x,t) \\ \partial_t \rho_{Bc}(x,t) = k_c\, \rho_B(x,t) \end{cases} \qquad \text{Eq. 47}$$

$$N_f(x,t) = \rho_{B0}\,(vt - x) e^{-\frac{x}{l_0}}\, U(vt - x) \qquad \text{Eq. 48}$$

où U est la fonction de Heaviside (fonction échelon) et l_0 est le rapport entre la vitesse v et le taux k_c. Ce résultat montre que le réseau atteindra son profil exponentiel à une position x_0 après un temps caractéristique de x_0/v. Pour former un réseau exponentiel sur une distance de 50 µm avec une concentration d'actine de 4 µM, le temps d'attente est alors de l'ordre de la dizaine de minutes et est comparable aux temps expérimentaux. Le temps d'établissement de la longueur caractéristique à l'origine est également de l'ordre de la dizaine de minutes et augmente pour des abscisses plus élevées (Figure 63.A, B et D). En revanche, la quantité d'actine monomérique étant constante, la polymérisation ne s'arrête jamais et la densité du réseau ne se stabilise pas (Figure 63.C).

Ainsi, entre la 10ième et la 30ième minute de polymérisation, le modèle prédit une augmentation de 10% de la longueur caractéristique et de 250% de la densité du réseau. De plus, la longueur caractéristique est indépendante de la concentration d'actine monomérique dans le bain contrairement à la densité du réseau (Figure 63.E et F). Cette indépendance était prévisible puisque nous supposons par construction un taux de coiffe proportionnel à la concentration d'actine. Ainsi, le comportement global est qualitativement en accord avec les données expérimentales. Néanmoins, la densité augmente deux fois plus vite au cours du temps que dans nos expériences (Figure 63.C) ; l'augmentation de la densité avec la concentration d'actine est également trop élevée (facteur 8 à comparer à un facteur 3,5) (Figure 63.F).

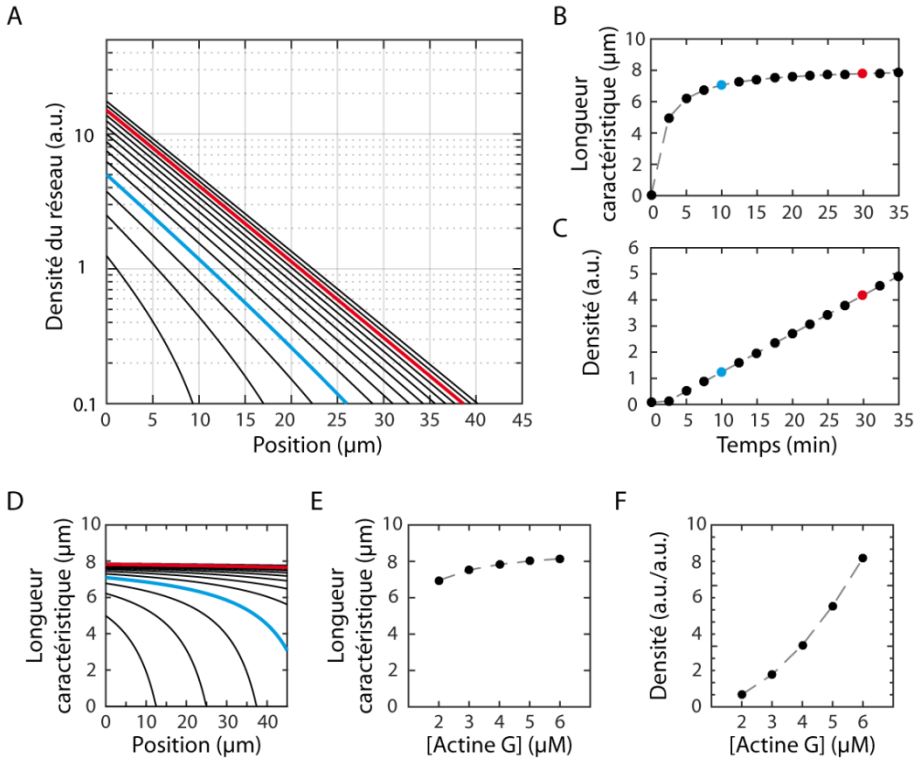


Figure 63 : Evolution de la polymérisation d'un réseau parallèle calculée à partir des équations Eq. 47 (concentration en actine monomérique constante). A : Profil du réseau calculé toutes les 150 secondes entre t= 2 min 30 s et t= 35 min. B : Evolution temporelle de la longueur caractéristique du réseau estimée en x= 0. C : Evolution de la densité du réseau à x= 10 µm. D : Longueur caractéristique maximale des profils après 30 min de polymérisation en fonction de la concentration d'actine monomérique. E : Densité maximale à la position x= 10 µm après 30 min de polymérisation en fonction de la concentration d'actine monomérique. Bleu : t= 10 min. Rouge : t= 30 min. Le taux d'apparition de nouveaux bouts sur la ligne de nucléation (x= 0) est constant. La concentration en monomères d'actine est constante et égale à 4 µM. Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} sont imposées respectivement à 8 µM.s^{-1} et 2 s^{-1}. Le taux de coiffe des filaments est fixé à 2,7×10^{-3} µM^{-1}.s^{-1}.

L'étape finale consiste à prendre en compte la consommation de l'actine au cours du temps. Cet ajout produit des simulations dont les comportements (Figure 64) sont très similaires aux expériences. Ainsi, entre la 10ième et la 30ième minute de polymérisation, la longueur moyenne des filaments progresse de 7% (Figure 64.B) (expérimentalement 15%) tandis que la densité mesurée à la position x= 10 µm augmente de 150% (Figure 64.C) (expérimentalement 90%). De même, la longueur caractéristique dépend faiblement de la concentration initiale d'actine (Figure 64.E) alors que la densité augmente de 235% lorsque la concentration d'actine passe de 2 à 6 µM (Figure 64.F) (expérimentalement 260%).

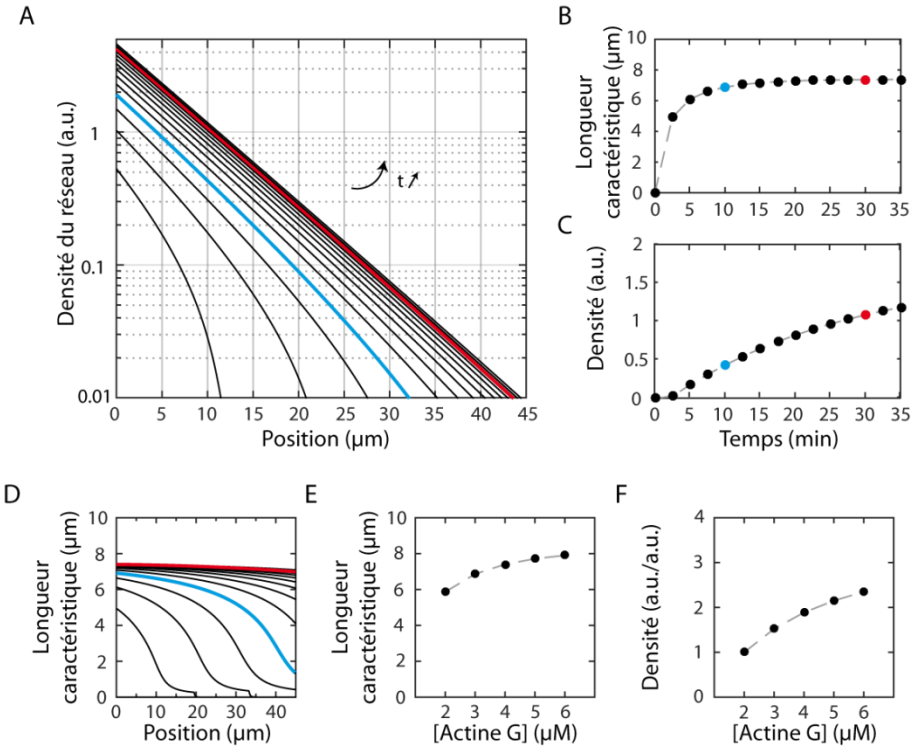


Figure 64 : Evolution de la polymérisation d'un réseau parallèle calculée à partir des équations Eq. 47 (concentration en actine variable). A : Profil du réseau calculé toutes les 150 secondes entre t= 2 min 30 s et t= 35 min. B : Evolution temporelle de la longueur caractéristique du réseau estimée en x= 0. C : Evolution de la densité du réseau à x= 10 µm. D : Longueur caractéristique maximale des profils après 30 min de polymérisation en fonction de la concentration d'actine monomérique. E : Densité maximale en x= 10 µm en fonction de la concentration d'actine monomérique après 30 min de polymérisation. Bleu : t= 10 min. Rouge : t= 30 min. Le taux d'apparition de nouveaux bouts sur la ligne de nucléation (x= 0) à un instant t est proportionnel à l'écart entre la concentration en actine monomérique disponible à cet instant et la concentration critique. La concentration en monomères d'actine est de 4 µM à t= 0. Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} sont respectivement de 8 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ et 2 s^{-1}. Le taux de coiffe des filaments est fixé à $2{,}7\times10^{-3}$ $\mu M^{-1}.\ s^{-1}$.

c. Discussion

Notre modèle permet d'expliquer la structure dynamique d'un réseau d'actine telle que nous l'avons observée expérimentalement, mais il suppose un évènement (rare) de coiffe qui bloque la dynamique de polymérisation (association d'un monomère) et de dépolymérisation (dissociation d'un monomère) au bout barbé des filaments d'actine. Ce comportement est caractéristique des protéines de coiffe. Nous n'avons pas rajouté de protéine de coiffe dans nos solutions, même si nous ne pouvons exclure une contamination de l'actine due à une purification imparfaite de la protéine. La constante d'association de la protéine de coiffe CapZ à l'actine est k_{CAP}= 3,5 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ (Schafer et al. 1996). Pour rendre compte de nos observations, nous avons estimé un taux de coiffe $k'_c \approx 2{,}5\times10^{-3}$ $\mu M^{-1}.s^{-1}$par unité de concentration initiale d'actine monomérique. Pour que la protéine CapZ soit responsable du mécanisme de coiffe évoqué par notre modèle, il faudrait donc un taux de contamination k'_c/k_{CAP}= 0,1% de nos solutions d'actine. Nous utilisons de l'actine industrielle (référence AKL99 de Cytoskeleton) avec une pureté >99% ; CapZ pourrait en principe se

trouver en quantité suffisante dans le 1% restant… D'autres possibilités sont cependant à considérer. Par exemple, il a été montré que le marquage de l'actine par un fluorophore peut influencer la cinétique de polymérisation aux bouts barbés (Amann et al. 2001, Kuhn et al. 2005). Plus le marquage est important, plus la cinétique de polymérisation est lente, jusqu'à l'arrêt total de la polymérisation pour une décoration de 90% des monomères. Nous utilisons une décoration de 20% de l'actine. Il est tentant de spéculer que le blocage rare de la polymérisation par l'actine marquée n'est pas absurde. D'autres études ont également proposé qu'un processus de fragmentation spontanée puisse être à l'origine de la distribution exponentielle de la longueur des filaments qui est observée dans un gel d'actine formé par une polymérisation en volume (Sept et al. 1999, Fass et al. 2008, Schmoller et al. 2011). Il serait intéressant d'étudier plus en détail l'effet de la fragmentation sur la dynamique du réseau. Enfin, la dynamique de nucléation des filaments sur le motif de surface est complexe, et il est possible que la description que nous en faisons soit trop simple.

B Mouvements de billes passives

Dans cette partie, nous étudions le mouvement de billes passives lorsqu'elles sont placées dans un réseau parallèle ou antiparallèle de filaments d'actine. Les billes sont passivées en les couvrant de BSA ou de PEG (voir page 57) ; cette dernière molécule fournit une passivation plus efficace (voir ci-dessous). L'agent de déplétion (la méthylcellulose) plaque les billes contre le feuillet d'actine ; les billes restent donc dans le plan d'observation. Bien qu'elles soient passives, nous observons que les billes interagissent avec les filaments d'actine, ce qui conduit à des comportements diffusifs anisotropes, parfois très complexes, ainsi qu'à une faible exclusion des billes des zones denses du réseau.

1. Description qualitative des trajectoires

La Figure 65 présente l'allure générale des trajectoires de billes passives pour un motif de nucléation de l'actine constitué de six lignes parallèles. Environ 50% des billes BSA sont collées à la surface, preuve que la passivation n'est pas optimale ; avec une passivation au PEG ce pourcentage tombe à 20%.

Les billes mobiles présentent (grossièrement) six types de trajectoires (Figure 66). Sur les lignes de nucléation, c'est-à-dire dans le réseau branché, certaines billes se déplacent verticalement (axe Y), ce qui suggère que le réseau n'est pas isotrope (Figure 66.A). La microscopie de fluorescence confirme que les filaments d'actine peuvent s'aligner suivant l'axe Y, c'est-à-dire parallèlement à la bordure des lignes de nucléation (Figure 67) ; il est probable que cette organisation puisse être suffisamment marquée pour contraindre la diffusion des billes à suivre une 'rigole' le long de la ligne de nucléation. Toujours sur le réseau branché, certaines billes présentent des trajectoires composées d'explorations locales interrompues par des explorations à plus large échelle ; ce comportement ressemble à un vol de Levy (Figure 66.B). Il est possible d'imaginer que le réseau branché renferme des mailles capables de piéger des billes.

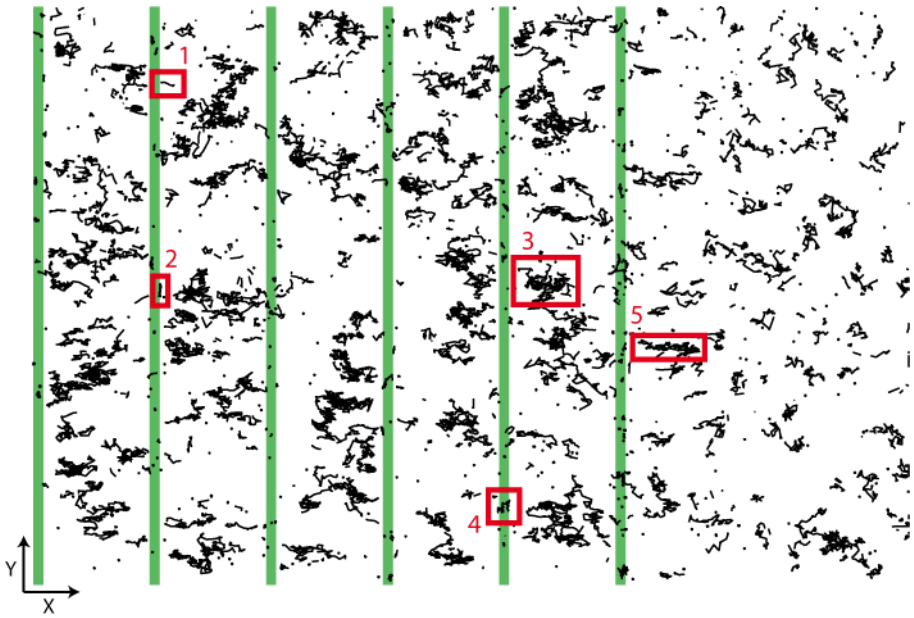


Figure 65 : Trajectoires des billes passives (noir) dans un réseau de filaments d'actine polymérisés à partir de lignes de nucléation (vert). Les lignes ont une largeur de 3 µm et sont espacées de 40 µm. Différents types de trajectoires sont encadrés en rouge. 1 : Mouvement dirigé le long des filaments. 2 : Mouvement dirigé le long de la ligne de nucléation. 3 : Mouvement de diffusion faiblement anisotrope. 4 : Mouvement de vol de Levy sur la ligne de nucléation. 5 : Mouvement de diffusion fortement anisotrope.

La plupart des billes positionnées entre les lignes de nucléation présentent un mouvement diffusif plus ou moins anisotrope (Figure 66.C-D) ; le mouvement est plus favorable le long des filaments d'actine (axe X). Cette anisotropie reflète la structure striée du réseau due à l'alignement des filaments. A une distance d'environ 40 µm de la ligne de bordure du motif (à droite sur la Figure 65), les trajectoires deviennent isotropes ; cela nous donne une mesure fonctionnelle de l'extension latérale du réseau parallèle qui émerge de cette ligne de nucléation. Dans de rare cas, à la fois dans le réseau antiparallèle et parallèle, il apparaît des trajectoires rectilignes dirigées suivant l'axe des filaments (axe X) (Figure 66.E) ou des 'vols de Levy' avec une exploration locale préférentielle suivant cet axe (Figure 66.F). En résumé, même si les billes sont ici passivées, elles interagissent avec les filaments d'actine et le mouvement des billes trahit l'organisation sous-jacente du réseau. Il est clair que les billes se déplacent plus facilement le long des filaments d'actine que suivant l'axe perpendiculaire.

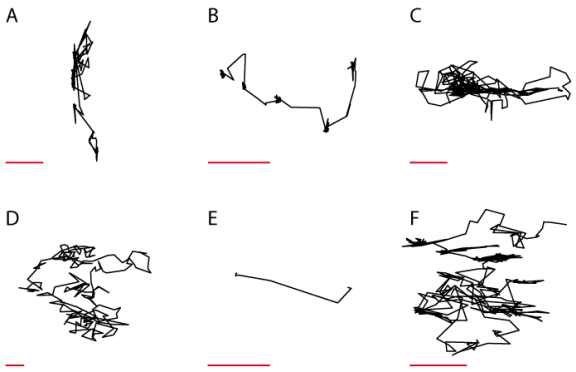


Figure 66 : Variété des trajectoires de billes BSA. Echelle 2 µm (Barre rouge). L'axe vertical représente la direction des lignes. Les catégories A et B se retrouvent dans les réseaux branchés (sur les lignes) tandis que les catégories C, D, E et F s'observent dans les réseaux parallèles et antiparallèles. La catégorie D (mouvement Brownien isotrope) est également observée sans réseau.

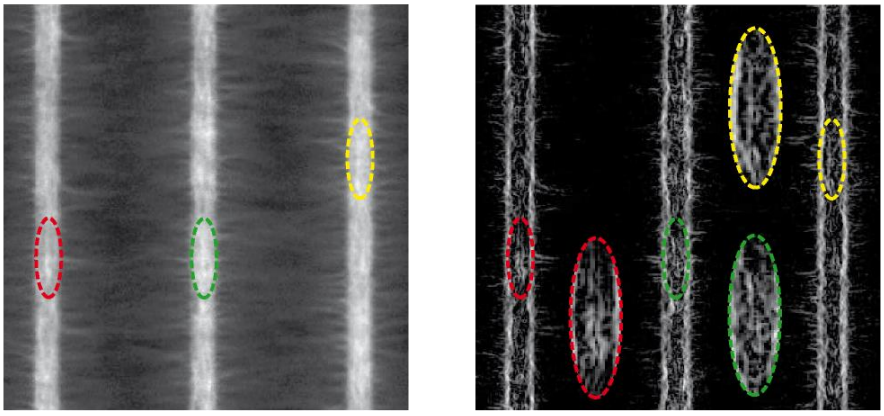


Figure 67 : Structure du réseau branché sur la ligne de nucléation. Dans les trois zones encerclées, les filaments d'actine présentent une orientation préférentielle le long des lignes de nucléation. A gauche : image en fluorescence du réseau d'actine polymérisé à partir de lignes de nucléation de 3 µm de largeur et espacées de 40 µm. A droite : contours déduits du cliché de droite et images agrandies des trois zones d'intérêts.

2. Analyse globale des trajectoires

Après l'analyse qualitative développée au paragraphe précédent, nous nous intéressons à présent au comportement moyen d'un grand nombre de trajectoires de billes mobiles ; les billes immobiles sont exclues de l'analyse. Nous ne considérons que les billes situées à une distance suffisante (quelques micromètres) des lignes de nucléation. Les billes évoluant sur les réseaux branchés, dont les mouvements sont plus complexes, ne sont pas prises en compte.

La Figure 68 présente l'ensemble des trajectoires des billes BSA dans les zones antiparallèle (panel A ; entre deux lignes de nucléation), parallèle (panel B ; prêt de la ligne de bordure) ou en l'absence de réseau (panel C ; loin de la ligne de bordure). Cette analyse confirme l'existence d'une direction privilégiée du mouvement suivant l'axe des filaments d'actine (axe X) dans le réseau parallèle ou antiparallèle, alors que les trajectoires sont isotropes en l'absence d'actine. L'anisotropie du mouvement peut être caractérisée en effectuant une régression linéaire des trajectoires (Annexe

page 157). Cette procédure permet de déterminer l'orientation principale du mouvement et ainsi de construire un histogramme polaire des directions des trajectoires (Figure 68.D-F). Il est à noter que dans le cas du réseau parallèle, le mouvement présente un sens privilégié : les billes semblent s'éloigner de la ligne de nucléation, c'est-à-dire de la zone dense du réseau d'actine. Autrement dit, il apparaît un phénomène de répulsion des billes des zones denses du réseau.

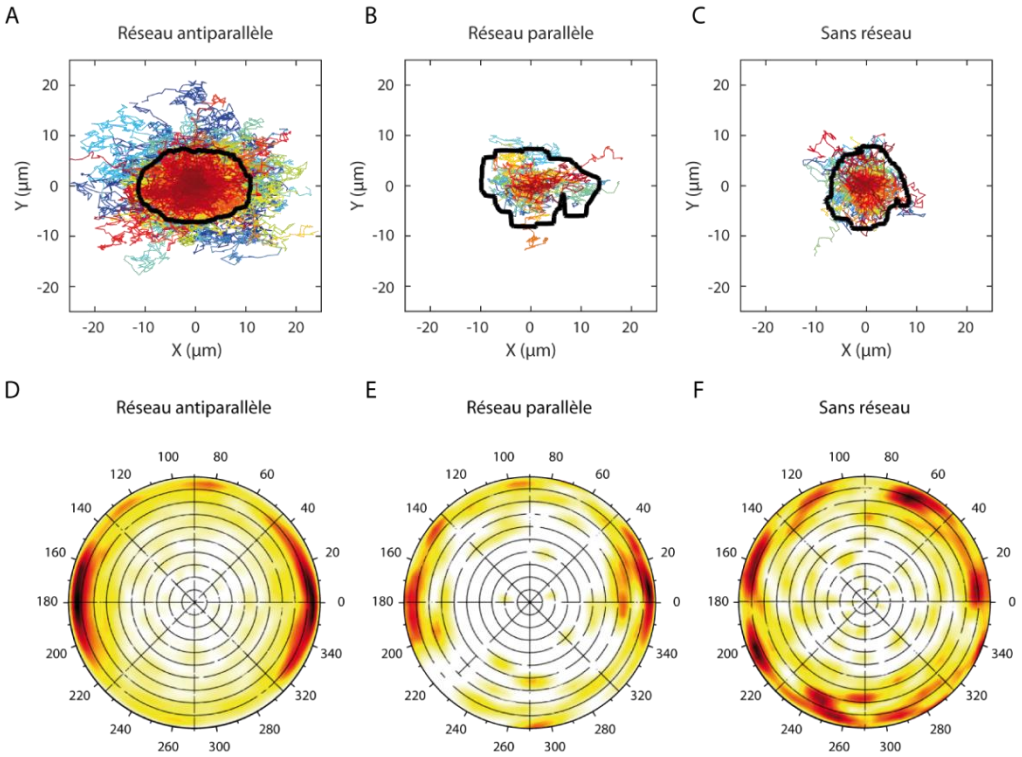


Figure 68 : Exploration des billes BSA. Panels A-B-C : Trajectoires des billes. L'axe des filaments est noté X et l'axe perpendiculaire Y. Sur les graphes, la position initiale des billes est ramenée à l'origine du repère. Les durées des trajectoires sont différenciées par un gradient de couleur, avec en bleu celles qui durent le plus longtemps et en rouge les trajectoires les plus courtes. La zone délimitée par le tracé noir englobe 97% des trajectoires. Panels D-E-F : Les graphes représentent les histogrammes polaires des directions des trajectoires (angle compris entre 0 et 180) et de l'indice de confiance associé (R^2 compris entre 0 et1). L'angle est nul lorsque les trajectoires sont alignées avec les filaments d'actine et que le sens du mouvement est vers les x positifs (voir Figure 55). L'indice de confiance varie par pas de 0,1 (cercles concentriques) ; le cercle extérieur représente ainsi un indice de confiance de 1. La densité de population des histogrammes est représentée par une échelle colorimétrique. L'intensité augmente du blanc au noir, en passant par des nuances allant du jaune au rouge. Panels A-D : réseau antiparallèle, n= 797. Panels B-E : réseau parallèle, n= 77. Panels C-F : sans réseau, n= 178.

Enfin, le calcul du déplacement quadratique moyen (MSD) permet de compléter l'analyse quantitative de l'anisotropie du mouvement des billes (Figure 69). Le déplacement quadratique moyen croît linéairement avec le temps, ce qui indique un comportement global diffusif. De ces relations sont extraits un coefficient de diffusion D_X suivant l'axe des filaments (axe X) et un coefficient de diffusion D_Y suivant l'axe perpendiculaire (axe Y). Pour les billes BSA, l'anisotropie du mouvement dans le réseau antiparallèle se traduit par le rapport $D_X/D_Y = 2{,}5$ (Tab. 9). Un rapport

d'anisotropie similaire est observé dans les réseaux parallèles, ce qui suggère que la polarité des filaments n'influence pas la diffusion des billes.

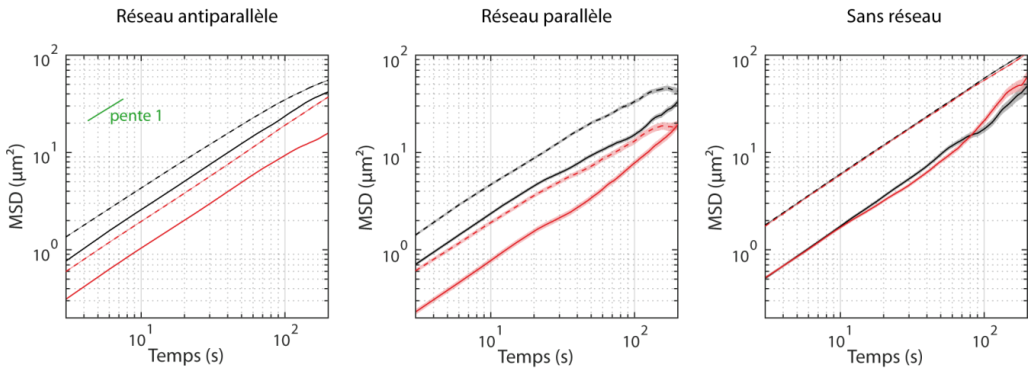


Figure 69 : Déplacement moyen carré (MSD) des billes BSA (-) et PEG (--) en fonction du temps. En noir : mouvements suivant l'axe des filaments (axe X). En rouge : mouvements suivant l'axe orthogonal aux filaments (axe Y). Réseau antiparallèle : Bille BSA : n= 538 ; Bille PEG : n= 1085. Réseau parallèle : Bille BSA : n= 31 ; Bille PEG : n= 45. Sans réseau : Bille BSA : n= 64 ; Bille PEG : n= 473.

Les billes PEG démontrent un comportement très similaire aux billes BSA (Annexe Figure 113), à une nuance près : la diffusion est plus rapide avec les billes PEG qu'avec les billes BSA (Tab. 9). De plus, avec les billes PEG, le coefficient de diffusion suivant l'axe des filaments (axe X) est plus faible de 20% par rapport à la diffusion libre en l'absence d'actine. Avec les billes BSA, l'inverse se produit : la diffusion est plus importante (+30%) en présence d'actine. Nous interprétons ces différences par le fait que la BSA est un moins bon passivant que le PEG (Valentine et al. 2004), ce qui suggère une interaction plus forte des billes BSA avec la surface. Nous nous sommes aperçus que les trajectoires complètes de billes BSA renferment des périodes d'immobilité (Figure 70). Même si notre algorithme d'analyse des trajectoires coupe les parties de la trajectoire durant laquelle la bille s'immobilise (voir page 70), cette procédure n'est pas parfaite et des arrêts du mouvement vont inévitablement conduire à une diminution du coefficient de diffusion estimé.

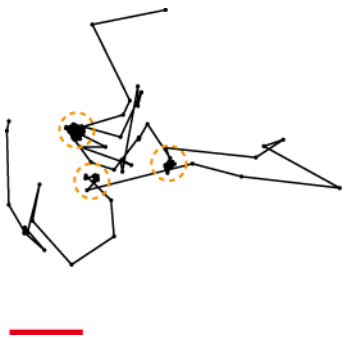


Figure 70 : Exemple de trajectoire d'une bille BSA en diffusion libre (pas d'actine). Echelle 2 µm (Barre rouge). Les périodes d'immobilisation de la bille sont encerclées en orange.

Pour caractériser les évènements d'accrochage/décrochage des billes avec la surface, nous avons extrait des trajectoires complètes les périodes moyennes d'immobilité (T_i) et de mobilité (T_m) (Tab. 10). Cette analyse confirme que les billes

PEG sont mieux passivées que les billes BSA ; les durées moyennes d'immobilisation sont nettement plus faibles. Il est à noter que la statistique d'accrochage/décrochage des billes PEG à la surface dépend peu de la présence d'un réseau d'actine alors que les billes BSA sont plus mobiles en présence d'un feuillet d'actine. Il semblerait donc que le réseau d'actine 'écrante' l'interaction des billes BSA avec la surface.

Passivant	Axe	Diffusion (µm²/s)			Ratio $\|\|_{\pm}$ X/Y
		Réseau $\|\|_{\pm}$	Réseau $\|\|$	Ø	
BSA	X	0,129 ± 0,002	0,12 ± 0,004	0,084 ± 0,005	2,5
	Y	0,052 ± 0,001	0,038 ± 0,001	0,08 ± 0,01	
PEG	X	0,224 ± 0,002	0,24 ± 0,03	0,3 ± 0,002	2,3
	Y	0,099 ± 0,002	0,1 ± 0,01	0,29 ± 0,001	

Tab. 9 Tableau des coefficients de diffusion des billes passives selon le réseau. Les coefficients sont calculés à partir d'une régression linéaire de la relation entre le déplacement quadratique moyen (MSD) et le temps sur les premiers points. La direction des filaments définit l'axe X, sa perpendiculaire définit l'axe Y. Trois configurations sont étudiées : le réseau antiparallèle (noté $\|_{\pm}$), le réseau parallèle (noté $\|$) et l'absence de réseaux (noté Ø).

Passivant	Temps	Réseau $\|\|_{\pm}$	Réseau $\|\|$	Ø
BSA	T_i (s)	182	228	269
	T_m (s)	144	118	54
PEG	T_i (s)	87	91	121
	T_m (s)	198	173	199

Tab. 10 Durée d'immobilité (T_i) **et de mobilité** (T_m) **des billes passives.** Trois configurations sont étudiées : le réseau antiparallèle (noté $\|_{\pm}$), le réseau parallèle (noté $\|$) et l'absence de réseaux (noté Ø). BSA : $N_{i\|\pm}$= 550, $N_{f\|\pm}$= 394, $N_{i\|}$= 60, $N_{f\|}$= 23, $N_{iØ}$= 119 et $N_{fØ}$= 52. PEG : $N_{i\|\pm}$= 721, $N_{f\|\pm}$= 959, $N_{i\|}$= 23, $N_{f\|}$= 34, $N_{iØ}$= 34 et $N_{fØ}$= 467.

3. Distribution des billes

A partir du relevé des positions, nous pouvons calculer une densité de probabilité de présence des billes en fonction de leur position dans le réseau. Dans le cas du réseau antiparallèle (entre deux lignes de nucléation), la distribution des billes présente un maximum au centre (x= 0) ; dans le cas du réseau parallèle (une ligne de nucléation), nous observons une zone de déplétion à proximité de la ligne de nucléation (Figure 71). Ces deux observations indiquent à nouveau une interaction répulsive entre les billes et l'actine, qui conduit à un appauvrissement de billes dans les zones denses du réseau. La distribution présente également des pics sur les lignes de nucléation, mais ceux-ci disparaissent lorsque les billes mobiles seules sont analysées (voir page 70, Figure 74). Cette observation démontre que des billes peuvent être piégées dans les zones branchées et denses du réseau. Les billes PEG montrent un comportement similaire (Annexe Figure 114). Il est à noter que l'effet de centrage est tout de même assez limité.

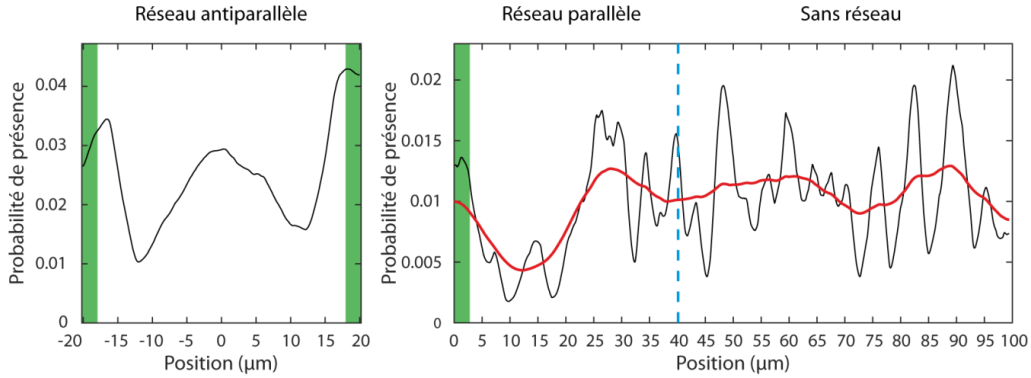


Figure 71 : Probabilité de présence des billes BSA (mobiles et immobiles) selon le réseau et la position suivant l'axe des filaments. En vert : lignes de nucléation. Réseau antiparallèle : n= 797. Réseau parallèle et sans réseau : n= 270. La densité de probabilité est lissée sur une fenêtre de 8 µm (rouge).

Si les billes sont à l'équilibre thermodynamique, la distribution des billes P doit obéir à la statistique de Boltzmann. L'énergie potentielle d'interaction U entre les billes et l'actine est alors décrite par l'Eq. 49.

$$U(x) = -k_B T \ln(P(x)) \qquad \text{Eq. 49}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T la température. Ce potentiel ne dépend pas du type de passivation utilisé (BSA ou PEG) et présente un puits d'une hauteur d'environ $3k_BT$ (Figure 72).

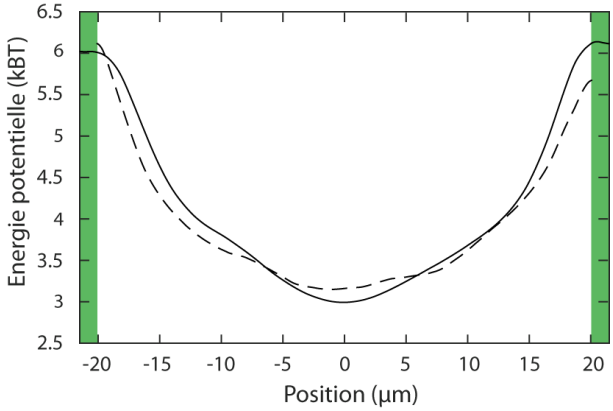


Figure 72 : Potentiel d'interaction du réseau de filaments d'actine avec les billes passives. Le potentiel est donné par l'Eq. 49 à partir des données de la Figure 74. Il est estimé 30 min après la polymérisation du réseau. Ligne : Bille BSA. Pointillé : Bille PEG. Vert : lignes de nucléation.

4. Analyse locale des mouvements : vitesse et diffusion en fonction de la position

Afin de tester l'influence de la structure du réseau sur les mouvements observés, nous avons calculé le déplacement moyen (MD) et le déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps, pour des billes situées à différentes positions le long de l'axe X du réseau à l'origine des temps (voir page 71 ; Figure 73 ; annexe Figure 115). Comme il est possible de s'y attendre par un simple argument de symé-

trie, le déplacement moyen est nul et le MSD croît linéairement avec le temps (comportement diffusif) pour les billes situées à mi-distance des deux lignes de nucléation. En revanche, si la position initiale des billes s'éloigne de ce point de symétrie, le déplacement moyen croît au court du temps et ceci d'autant plus rapidement que cette position s'éloigne du centre du motif. Ce déplacement moyen traduit un mouvement dirigé vers le centre du motif. Ce mouvement dirigé se traduit également par le fait que la pente du MSD en fonction du temps devient supérieure à 1. Nous retrouvons donc le fait que les billes sont 'repoussées' des zones denses du réseau d'actine.

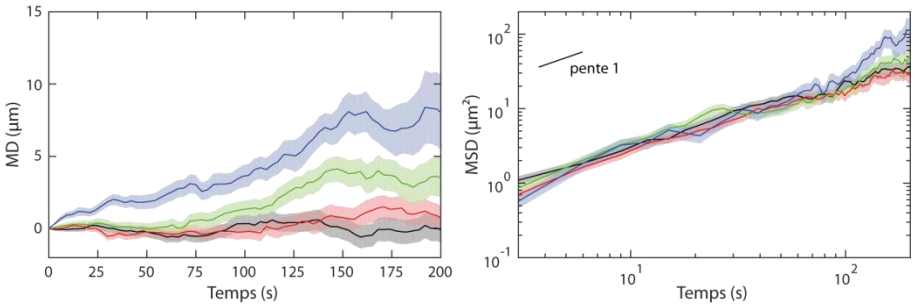


Figure 73 : Déplacement moyen (MD) et déplacement quadratique moyen (MSD) de billes BSA dans un réseau antiparallèle à partir de différentes positions entre les deux lignes de nucléation. Les lignes de nucléation sont espacées de 40 µm et ont une largeur de 3 µm. Le point à mi-distance des deux lignes définit le centre du réseau. Le déplacement moyen (MD) et le déplacement quadratique moyen (MSD) sont estimés en fonction du temps pour les billes situées à l'origine des temps à des distances de 0 µm (noir), 5 µm (rouge), 10 µm (vert), et 15 µm (bleu) du centre du réseau.

Le calcul des déplacements moyens (MD) et des déplacements quadratiques moyens (MSD) permet d'estimer les profils de vitesse et de diffusion des billes en fonction de leur distance à une ligne de nucléation d'un réseau parallèle ou de leur position entre les deux lignes de nucléation d'un réseau antiparallèle (Figure 74). Il est à noter que la diffusion dans le réseau parallèle est plus faible que la diffusion libre, ce qui indique que l'actine contraint les fluctuations des billes. Dans le cas du réseau antiparallèle, nous retrouvons des coefficients de diffusion conformes à ceux obtenus par une analyse globale (Tab. 9), avec une anisotropie qui se traduit par le rapport $D_X/D_Y \sim 2{,}5$. Nous apprenons également ici que la diffusion est à peu près uniforme, c'est-à-dire que les valeurs des coefficients de diffusion dépendent peu de la position de la bille dans le réseau. De plus, nous observons que les billes peuvent présenter une vitesse de quelques dizaines de $nm.s^{-1}$ et que cette vitesse décroît vers zéro lorsque les billes se rapprochent du centre du motif (réseau antiparallèle ; deux lignes de nucléation) ou lorsque les billes sortent du réseau (réseau parallèle ; ligne de bordure). Les profils de vitesse et de diffusion permettent de calculer la distribution des billes à l'état stationnaire, en supposant que celle-ci résulte d'un processus de convection-diffusion. Cette distribution est en accord avec la distribution mesurée.

Il est à noter que près des lignes, la diffusion a tendance à chuter vers zéro et la vitesse à diverger. Ce comportement est un artefact dont la cause peut être double. Premièrement, il y a très peu de billes près des lignes de nucléation, à cause du phénomène de répulsion entre les billes et l'actine, ce qui augmente l'erreur de l'estimation. Deuxièmement, l'analyse génère des effets de bord (voir page 74).

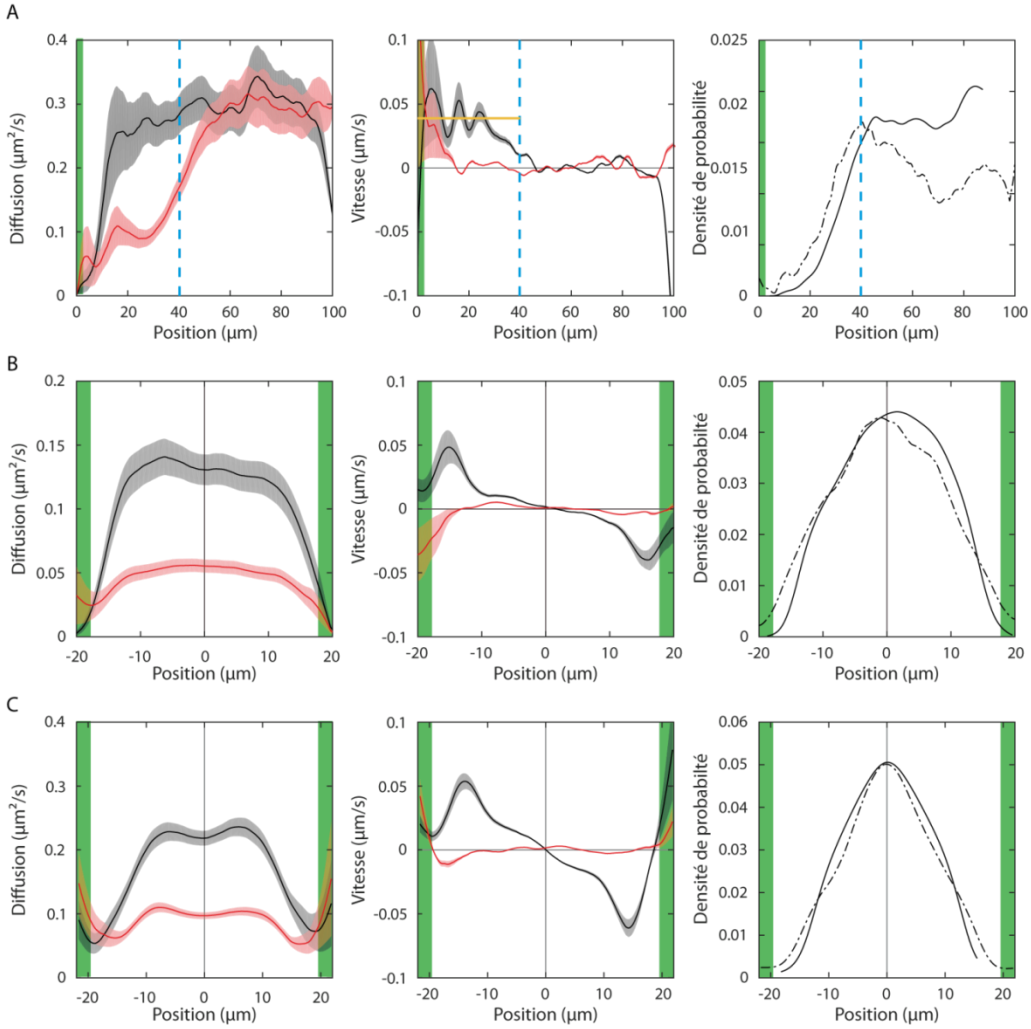


Figure 74 : Diffusion, vitesse et distribution des billes passives dans un réseau parallèle (A ; billes-PEG) et dans un réseau antiparallèle (B ; billes-BSA et C ; billes-PEG). Les lignes de nucléation sont indiquées en vert. La ligne pointillée bleue représente la limite de la zone d'influence du réseau d'actine sur le mouvement des billes. La ligne orange illustre la valeur moyenne de la vitesse des billes PEG dans le réseau parallèle. L'analyse ne prend en compte que les parties mobiles des trajectoires. Les vitesses et coefficients de diffusion sont estimés pour des mouvements d'une durée de 12 s à partir de la position de référence. La probabilité de présence (pointillé noir) est obtenue à partir des positions des billes mesurées à 30 min après le début de la polymérisation du réseau. La distribution stationnaire (ligne continue noire) est calculée à partir des profils de vitesses et de diffusions (voir page 76). Nombres de billes : 685 (panel A), 538 (panel B), 1085 (panel C).

C Transport de billes actives

1. Les myosines II et V

a. Transport dans les réseaux parallèles

Le mouvement des myosines II et V est dirigé suivant le bout barbé du filament d'actine. Lorsque ces moteurs sont couplés à une bille (cargo), nous nous attendons à observer des mouvements dirigés s'éloignant des lignes de nucléation. C'est effectivement le cas, jusqu'à une distance d'environ 40 µm de la ligne (Figure 75 A et D). Au-delà, ces billes présentent un comportement diffusif isotrope, comme les billes passives, très probablement car elles n'interagissent plus avec des filaments d'actine et sont donc libres (Figure 74). L'analyse des profils de vitesse et de diffusion nous permet de définir fonctionnellement l'étendue latérale du réseau ; certains filaments d'actine atteignent une longueur d'au moins 40 µm. Près de la ligne de nucléation, la diffusion est non seulement anisotrope mais semble également être plus faible qu'en l'absence d'actine, même le long de l'axe des filaments (axe X). L'interaction entre les filaments d'actine et les billes de myosines semble donc diminuer l'amplitude des fluctuations des billes (voir aussi Figure 85). Comme nous pourrions nous y attendre au vu des vitesses mesurées dans les tests de motilité pour ces deux types de moteurs (voir Tab. 2 page 44 et Figure 45 page 63), les billes-myosines II présentent une vitesse supérieure à celle des billes-myosines V. Cependant les vitesses moyennes observées sont au plus de 200 $nm.s^{-1}$ avec la myosine II et de 75 $nm.s^{-1}$ avec la myosine V. Ces valeurs sont très inférieures aux valeurs obtenues dans un test de motilité (HMM-II : 2 $\mu m.s^{-1}$; HMM-V : 460 $nm.s^{-1}$). Ce résultat pourrait indiquer que les billes ne sont pas nécessairement en interaction avec un réseau à chaque instant (décrochages fréquents), la vitesse moyenne mesurée est ainsi plus faible.

En sélectionnant des trajectoires individuelles qui explorent l'axe X du réseau sur une distance supérieure à 10 µm, nous avons pu mesurer la vitesse maximale qu'une bille mobile (mouvement dirigé) peut atteindre au cours de sa trajectoire. Ces vitesses se rapprochent davantage des valeurs obtenues dans un test de motilité (en moyenne : HMM-II : 484 $nm.s^{-1}$; HMM-V : 235 $nm.s^{-1}$; Figure 76.A) et peuvent même (rarement) atteindre les valeurs usuelles (HMM-II : 1 $\mu m.s^{-1}$; HMM-V : 500 $nm.s^{-1}$). Ce résultat renforce le fait que les moteurs fonctionnent normalement lorsqu'ils sont couplés à une bille, mais qu'il existe différentes populations de billes. Certaines billes ne bougeraient pas à la même vitesse (par exemple des billes décrochées ou des billes faiblement fonctionnalisées) ce qui conduirait à une moyenne d'ensemble plus faible que la moyenne des vitesses maximales mesurées ici. Une autre possibilité serait que les billes soient soumises à une friction tellement importante que la vitesse des billes s'en trouve ralentie. Il est à noter que les trajectoires dirigées sont longues, probablement aussi longues que l'extension des filaments d'actine ne le permette (Figure 76.B).

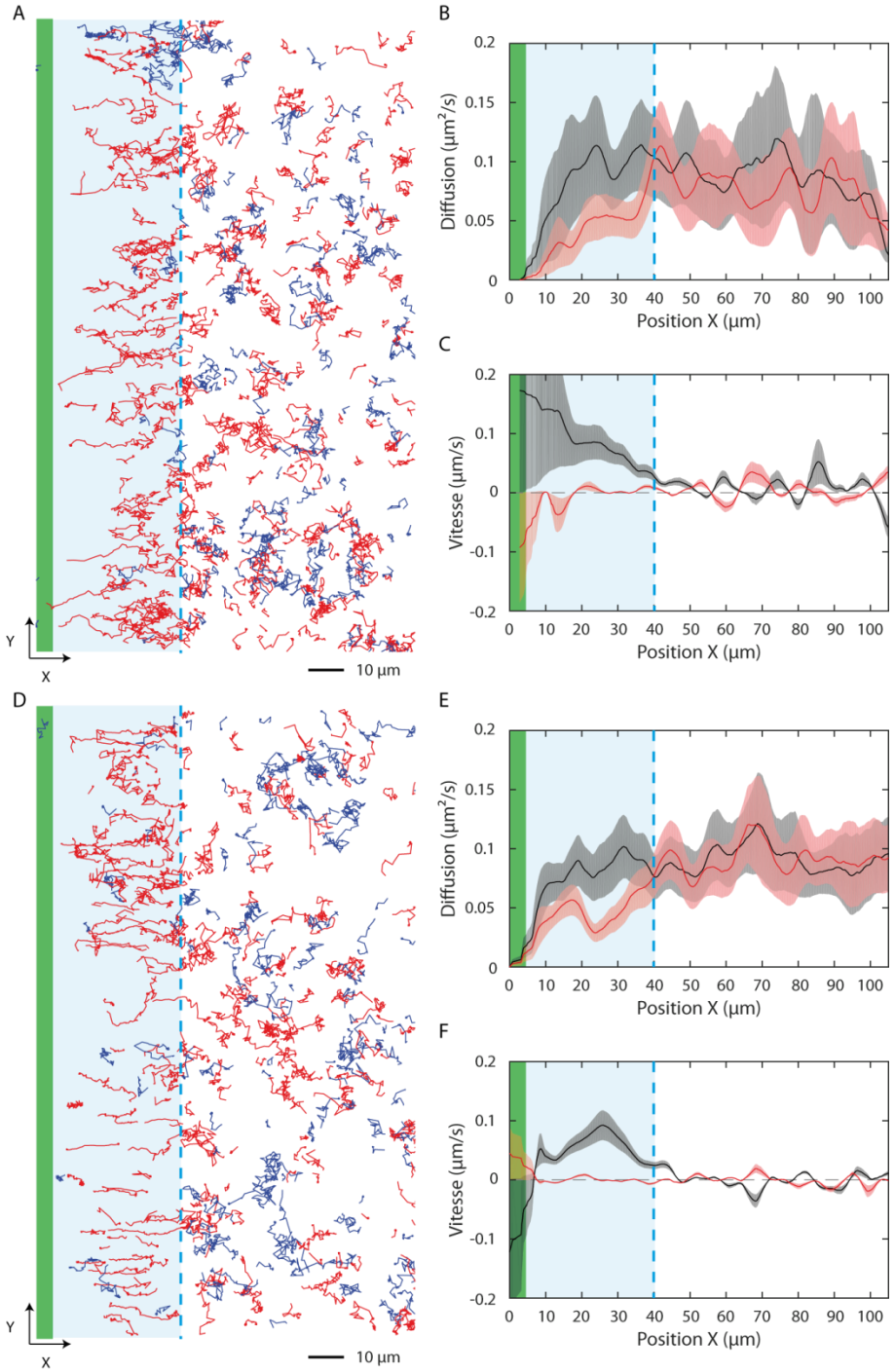


Figure 75 : Trajectoires de billes-myosines II (A-C ; n= 234) et de billes-myosines V (D-F ; n= 720) dans un réseau parallèle. Le réseau est polymérisé à partir d'une ligne de nucléation de 3 µm de largeur (vert). La région bleu-ciel délimite la zone d'influence du réseau sur les billes. Au-delà, les trajectoires correspondent à de la diffusion isotrope. A et C : trajectoires. En rouge : trajectoires dont le point final est plus éloigné de la ligne de nucléation que le point initial. En bleu : trajectoires dont le point final est moins éloigné de la ligne de nucléation que le point initial. B et E : Coefficient de diffusion suivant l'axe X (noir) et suivant l'axe Y (rouge) en fonction de la position suivant l'axe X. C et F : Vitesse suivant l'axe X (noir) et suivant l'axe Y (rouge) en fonction de la position suivant l'axe X. L'analyse ne prend en compte que les parties mobiles des trajectoires.

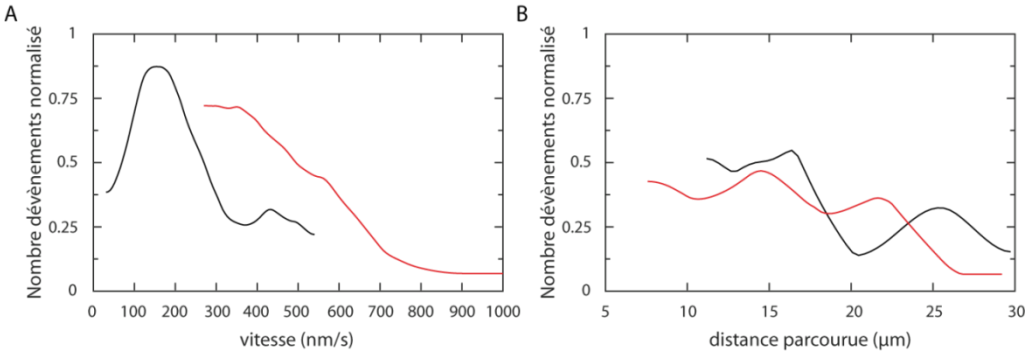


Figure 76 : Distribution des vitesses maximales (A) et des distances parcourues (B) mesurées sur des trajectoires individuelles dans le réseau parallèle. En noir : billes fonctionnalisées à la myosine V (n= 35). En rouge : billes fonctionnalisées à la myosine II (n= 16). Seules les trajectoires dont l'exploration (suivant l'axe X) est supérieure à 10 µm ont été analysées.

b. Transport dans un réseau antiparallèle : effet de centrage

b.1 Description qualitative des trajectoires, analyse globale

La Figure 77 (A et B) présente une vue panoramique du motif de nucléation et des trajectoires de billes fonctionnalisées avec des myosines II ou V lorsqu'elles évoluent dans un réseau de filaments d'actine antiparallèle. Certaines trajectoires, notamment pour les billes-myosines II, présentent une transition entre une partie dirigée et une partie diffusive ; d'autres semblent être purement diffusives ou, surtout pour les billes-myosines V, purement dirigées (Figure 77 C et D). Nous remarquons déjà une différence notable de comportement entre les billes-myosines II et les billes-myosines V : avec le second type de moteur, les trajectoires se terminent généralement par un arrêt de la bille tandis que les billes-myosines II présentent le plus souvent des fins de trajectoires diffusives. Les trajectoires des billes-myosines V apparaissent moins bruitées, c'est-à-dire que les déplacements perpendiculaires à la direction principale des trajectoires sont d'une amplitude plus faible. Il est à noter que les trajectoires se concentrent autour de la ligne médiane d'un couple de lignes de nucléation – la 'noircissant' –, ce qui indique que les billes passent la majeure partie du temps dans cette zone. Nous allons quantifier ces propriétés qualitatives un peu plus loin.

Le mouvement quadratique moyen (MSD) de l'ensemble des billes caractérise l'activité des myosines (Figure 78). Quand elle est tracée dans une échelle log-log, la relation entre le MSD mesuré suivant l'axe des filaments (axe X) et le temps présente une pente nettement supérieure à 1 pour les billes-myosines V (pente de 1,2) mais une pente proche de 1 pour les billes-myosines II. Le comportement des billes-myosines V est intermédiaire entre la diffusion pure (pente 1) et la convection pure (pente 2) et trahit l'importance des fluctuations pour le transport (les pentes sont plus proches de 1 que de 2). Même si des mouvements dirigés sont clairement observés dans les trajectoires des billes-myosines II (Figure 75), c'est la diffusion qui domine l'ensemble. Cependant, contrairement au comportement des billes passives (Figure 69), le MSD des billes-myosines II sature aux temps longs. Ce confinement est équivalent à la diffusion de billes dans une boîte de 12,5 µm de largeur (Annexe page 164) alors que les lignes

de nucléation sont espacées de 40 µm. Cette propriété reflète en fait un confinement actif des billes lié à leur mouvement convectif vers la ligne médiane d'un couple de lignes de nucléation (voir ci-dessous). Suivant l'axe Y, les deux types de bille active présentent un comportement purement diffusif (pente 1). Comme dans le cas des billes passives, la diffusion suivant l'axe des filaments est plus favorable que suivant l'axe perpendiculaire, ce qui se traduit par une anisotropie du mouvement. La diffusion suivant Y étant libre, il est à noter qu'aux temps longs les billes-myosines II présentent une inversion d'anisotropie : les mouvements suivant l'axe X étant confinés, le mouvement se fait préférentiellement suivant l'axe Y, car il est dominé par une exploration diffusive suivant cet axe. Dans le cas des billes-myosines V, le MSD laisse clairement transparaître un transport dirigé ; nous retrouvons ici que le transport des billes-myosines V est bien moins bruité que celui des billes-myosines II. Nous n'observons pas de saturation du MSD pour les billes-myosines V. Les billes ayant tendance à s'arrêter après un déplacement vers la ligne médiane du couple de lignes de nucléation (Figure 77), les trajectoires ne durent pas assez longtemps pour observer un confinement.

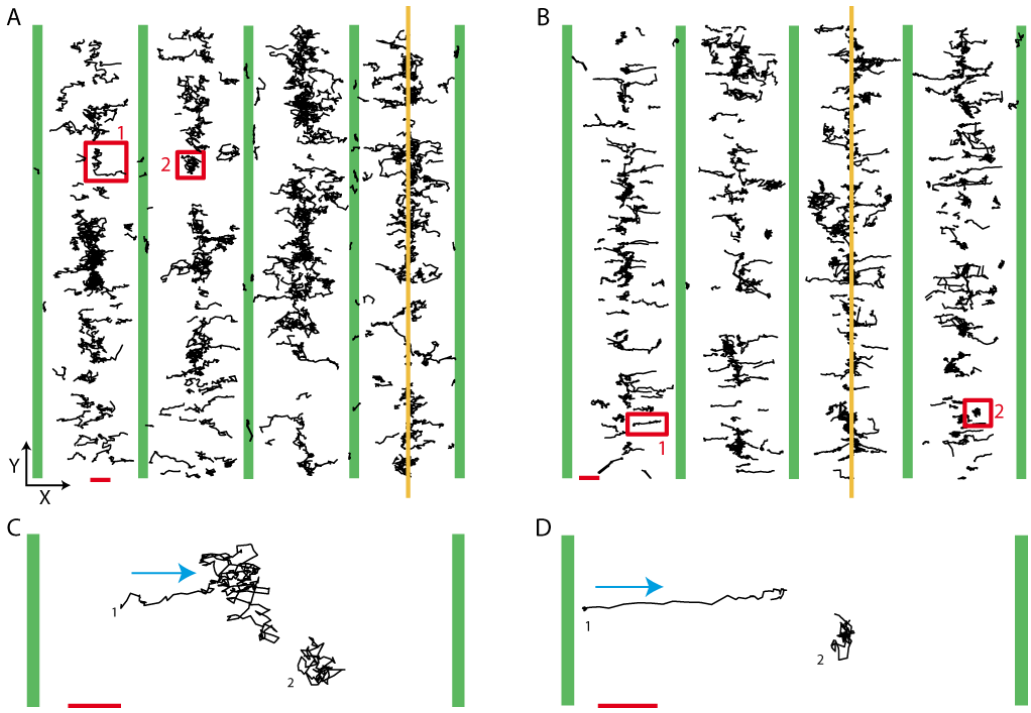


Figure 77 : Trajectoires (noir) de billes myosines II (A-C) et myosines V (B-D) dans un réseau antiparallèle. A-B : L'exploration des billes se concentre autour de la ligne médiane (orange) entre deux lignes de nucléation (vert). C : trajectoires typiques des billes myosines II encadrées en rouge sur le panel A. 1 : mouvement dirigé puis diffusif. La position initiale se situe aux abords de la ligne de nucléations. 2 : mouvement diffusif autour de la ligne médiane. D : trajectoires typiques des billes myosines V encadrées en rouge sur le panel B. 1 : mouvement dirigé prenant naissance aux abords de la ligne de nucléation et mourant au milieu du réseau. 2 : mouvement diffusif autour de la ligne médiane. Le motif de nucléation (vert) est constitué d'un ensemble de lignes de nucléation de 3 µm de largeur et espacées de 40 µm. Le sens de déplacement des billes est indiqué par une flèche bleue. Echelle : 5 µm (Barre rouge).

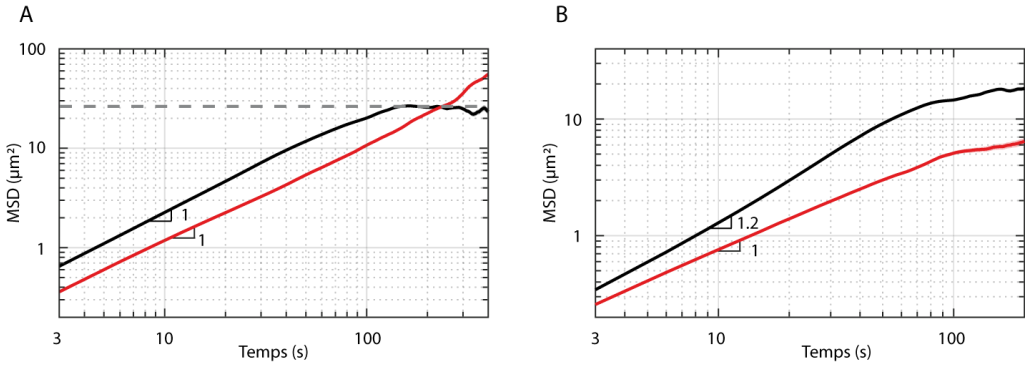


Figure 78 : Déplacement quadratique moyen de l'ensemble des trajectoires de billes fonctionnalisées de myosines. En noir : MSD suivant l'axe des filaments (axe X). En rouge : MSD suivant l'axe orthogonal aux filaments (axe Y). A : billes-myosines II, n= 1097. B : billes-myosines V, n= 668.

b.2 Centrage actif des billes

Après repliement des trajectoires pour les représenter sur une seule période du motif, il apparaît clairement que les trajectoires des billes transportées par la myosine II ou la myosine V sont dirigées vers la ligne médiane du couple de lignes de nucléation (Figure 79.A-C). L'effet de centrage actif des billes devient évident lorsque leurs trajectoires sont projetées sur l'axe X (l'axe des filaments) et qu'elles sont comparées aux mouvements de billes passives (Figure 79.D-F). Les billes venant des lignes de nucléation mettent un temps caractéristique compris entre 200 et 300 s pour arriver au centre du réseau, ce qui correspond à une vitesse moyenne de l'ordre de 50-100nm/s. Suivant l'axe Y, c'est-à-dire perpendiculairement à l'axe des filaments, les billes-myosines II présentent une exploration diffusive comparable à celle des billes passives (Figure 79.G-I). En revanche, la diffusion des billes-myosines V est significativement plus faible, appuyant l'idée de trajectoires davantage dirigées suivant l'axe des filaments. Ces observations sont en accord avec l'analyse globale présentée au paragraphe précédent (Figure 78).

Contrairement aux billes passives, les billes-myosines II ou V n'explorent qu'une demi-période du réseau. Etant donné que les lignes de nucléation sont espacées ici de 40 µm, cela correspond à une distance parcourue maximale de 20 µm. (Figure 80). Cependant, dans un réseau parallèle (près de la ligne de bordure du motif), les billes peuvent explorer des régions beaucoup plus étendues (Figure 80). Ces observations permettent de conclure que la structure bipolaire du réseau antiparallèle contraint le mouvement des billes et que les billes s'accumulent au point où la polarité nette du réseau est nulle.

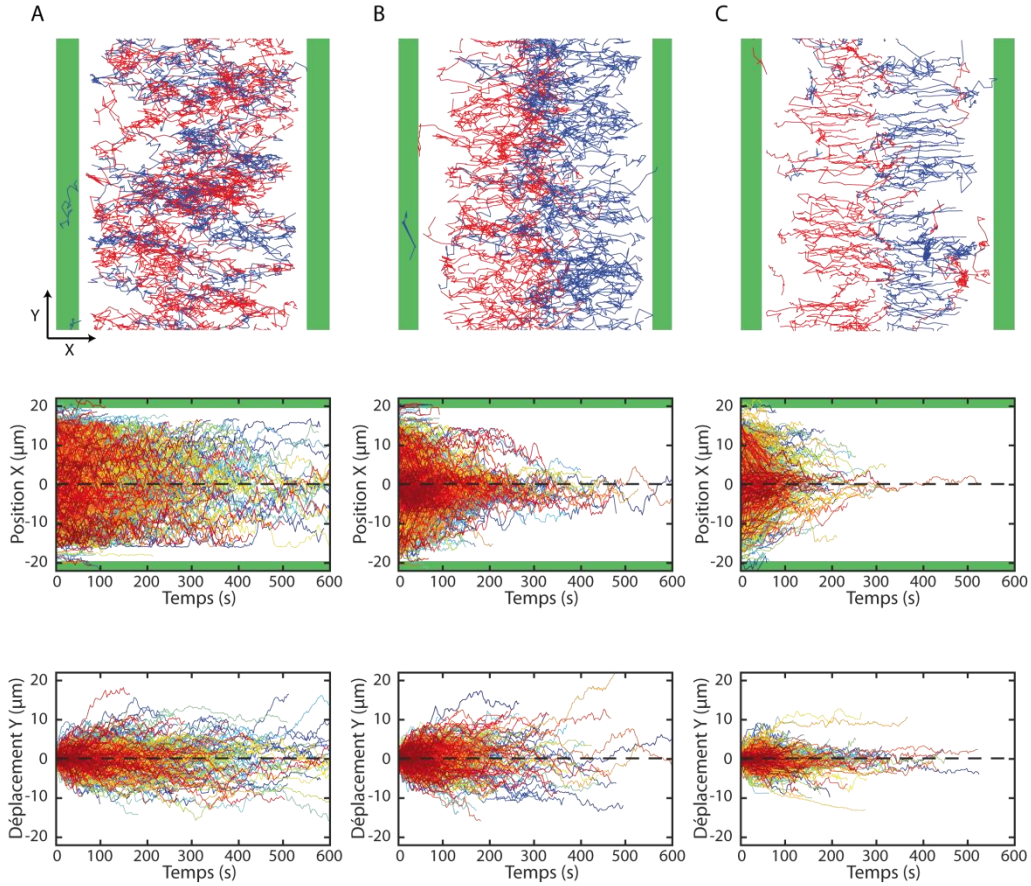


Figure 79 : Trajectoires dans un réseau antiparallèle ramenées à une période du motif de nucléation. Le motif est constitué d'un ensemble de lignes (vert) de 3 µm de largeur et espacées de 40 µm. 1ère ligne : Trajectoires dans le plan XY. En rouge : trajectoires dont le point final est à une abscisse x plus grande que celle du point initial. En bleu : trajectoires dont le point final est à une abscisse x plus petite que celle du point initial. 2ième ligne : Evolution temporelle des trajectoires, x(t), suivant l'axe des filaments (axe X). 3ième ligne : Evolution temporelle des trajectoires, y(t), suivant l'axe orthogonal aux filaments (axe Y). Colonne A : Billes passivées à la BSA. Colonne B : Billes fonctionnalisées à la myosine II. Colonne C : Billes fonctionnalisées à la myosine V.

La distribution des positions initiales des billes est plate (Figure 81). Afin d'estimer la distribution de position des billes à l'état stationnaire, nous ne prenons en compte que les trajectoires qui durent plus de 200 s et relevons la position de ces billes à partir de t= 200 s jusqu'à la fin de leurs trajectoires. Nous avons choisi cette durée d'équilibration car, comme nous l'avons déjà remarqué (Figure 79 D-F), c'est le temps nécessaire à une bille venant du bord du motif de nucléation pour atteindre la ligne médiane. La distribution obtenue confirme l'effet de centrage : la densité de probabilité présente un maximum à mi-distance entre les lignes de nucléation. L'évolution temporelle de la distribution des positions des billes, de la distribution des positions initiales vers la distribution des positions à l'état stationnaire, démontre clairement le transport des billes vers la ligne médiane du couple de lignes de nucléation. Il est à noter que la distribution de la position des billes après t= 200 s correspond à un profil gaussien (Annexe Figure 118).

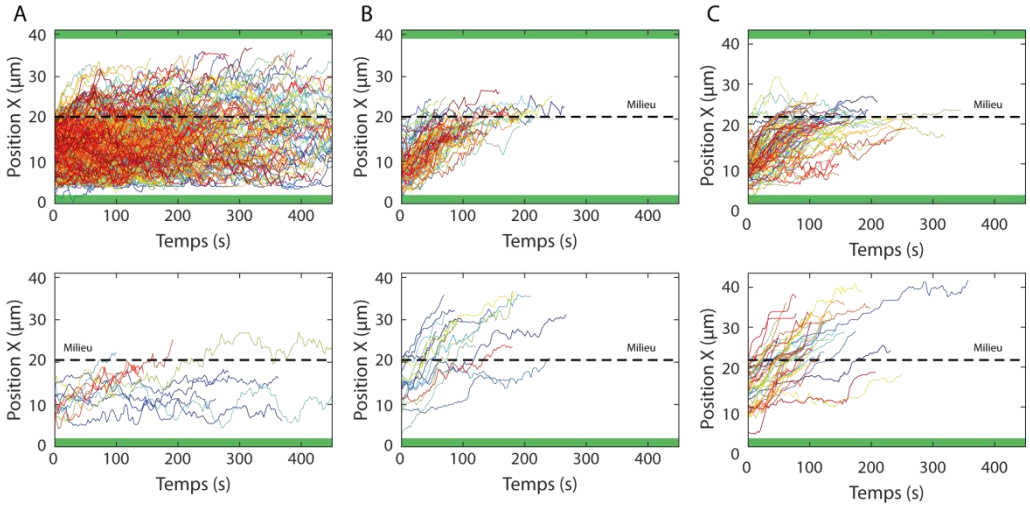


Figure 80 : Comparaison des distances parcourues suivant l'axe des filaments (axe X) dans un réseau parallèle et un réseau antiparallèle. Seules les trajectoires x(t) dont l'exploration dépasse les 10 µm sont prises en compte. L'abscisse 0 représente le centre d'une ligne de nucléation. 1ère ligne : trajectoires dans un réseau antiparallèle polymérisé à partir d'un ensemble de lignes de nucléation de 3 µm de largeur et espacées de 40 µm (vert). Les trajectoires sont repliées afin d'imposer que leurs positions initiales soient comprises dans une même demi-période (ici entre x= 0 et 20 µm). 2ième ligne : trajectoires dans un réseau parallèle polymérisé à partir d'une ligne de nucléations de 3 µm de largeur (vert). En pointillé noir : position de la ligne médiane du réseau antiparallèle. Colonne A : Billes passivées à la BSA. Colonne B : Billes fonctionnalisées à la myosine II. Colonne C : Billes fonctionnalisées à la myosine V.

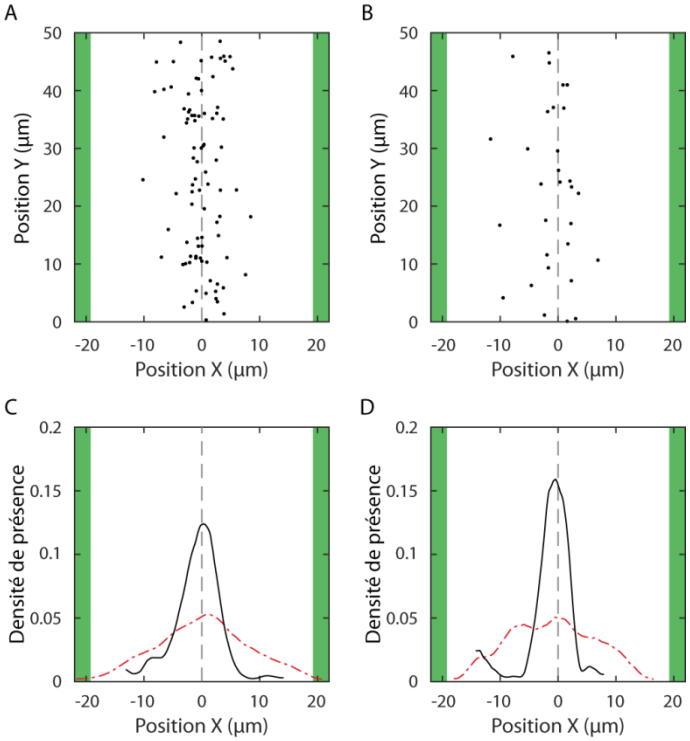


Figure 81 : Distribution de position des billes dans un réseau antiparallèle. (A-B) Position d'un échantillon représentatif de billes sur une période du motif entre les deux lignes de nucléation (vert). (C-D) Densité de probabilité de position sur l'axe X à l'instant initial des trajectoires (tirets rouges) et au bout de 200 s (ligne noire). Les panels A et C correspondent aux billes-myosines V alors que les panels B et D correspondent aux billes-myosines II.

b.3 Analyse locale des mouvements : profil de vitesse, de diffusion, et transport par convection-diffusion

Comme dans le cas des billes passives (Figure 74), le calcul des déplacements moyens (MD) et des déplacements quadratiques moyens (MSD) permet d'estimer les profils de vitesse et de diffusion des billes en fonction de leur position entre les deux lignes.

Pour les deux types de moteurs, nous observons que la vitesse (en valeur absolue) est maximale près des lignes de nucléation, qu'elle diminue lorsque les billes s'éloignent des lignes de nucléation pour s'annuler et changer de signe au centre (x= 0) (Figure 82). Comme nous l'avions déjà remarqué dans le réseau parallèle (page 103 et suivantes), les billes-myosines II vont plus vite que les billes-myosines V (100 $nm.s^{-1}$ versus 50 $nm.s^{-1}$) et les vitesses moyennes, mesurées à chaque position sur un ensemble d'un grand nombre de billes, sont très inférieures à celles mesurées dans un test de motilité, surtout pour la myosine II. Près du centre, le gradient de vitesse observé pour la myosine II (0,013 s^{-1}) est donc plus important que pour la myosine V (0,007 s^{-1} ; Figure 83). Il est à noter que ce gradient est presque uniforme sur l'intervalle x= ±5 µm. Pour chaque type de moteur, la distribution des vitesses maximales mesurées le long de trajectoires individuelles est très similaire à celle obtenue dans le réseau parallèle (Annexe Figure 116), comme nous pourrions nous y attendre étant donné que les vitesses maximales sont observées à proximité des lignes de nucléation, là où une polarité de l'actine domine (Figure 56.B) et où le réseau est donc essentiellement parallèle.

En accord avec l'analyse qualitative (Figure 77) et globale (Figure 78) des trajectoires, le coefficient de diffusion des billes-myosines II (D_X= 0,16 $\mu m^2.s^{-1}$ en x= 0) est plus important que pour la myosine V (D_X= 0,06 $\mu m^2.s^{-1}$; Figure 82 et Figure 83). Pour les deux types de moteurs, le profil de la diffusion suivant l'axe X présente un minimum local au centre du réseau (x= 0), alors qu'il est uniforme (sauf aux bords) suivant l'axe Y.

A partir des profils de vitesse et de diffusion (Figure 82), il est possible de calculer la distribution des billes attendue à l'état stationnaire, si le transport des billes par la myosine peut être décrit par un processus de diffusion-convection effectif (voir page 76). L'accord avec les distributions de positions mesurées est très bon (Figure 82), ce qui valide l'approximation d'un transport par convection diffusion. Il est à noter que la vitesse et le coefficient de diffusion locaux sont estimés en mesurant le déplacement des billes sur une durée de 12 s. Nous avons vérifié que les profils de vitesse et de diffusion ainsi que la distribution stationnaire des billes qui en résultent varient peu autour du choix de cette durée (voir Annexe Figure 117).

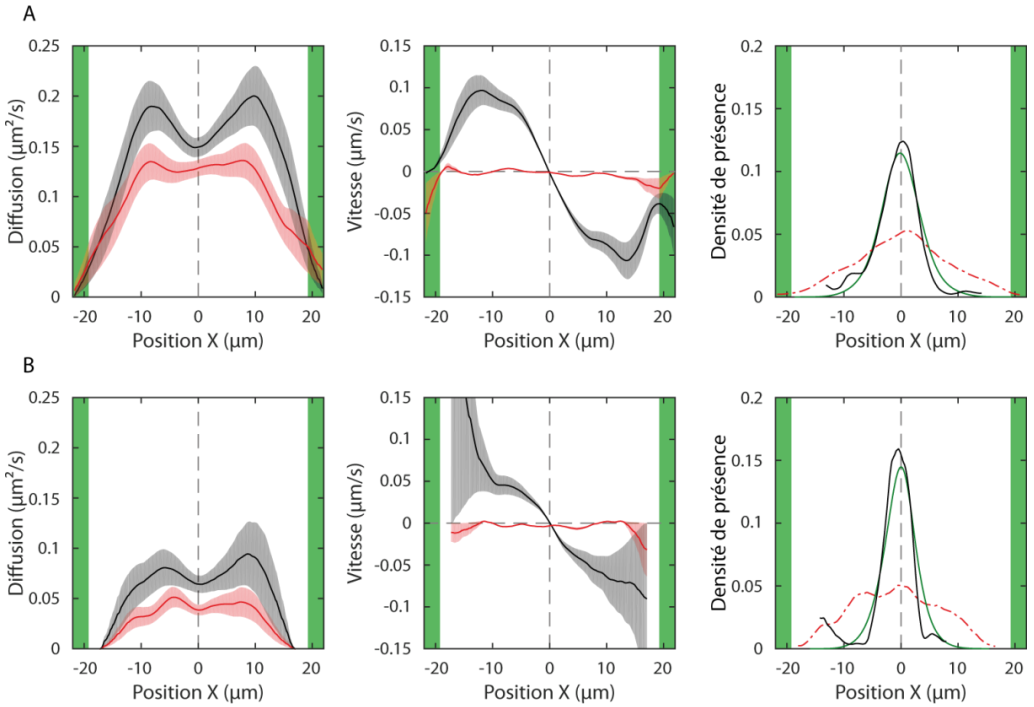


Figure 82 : Diffusion, vitesse et distribution des billes-myosines II (A) et des billes-myosines V (B) dans un réseau antiparallèle. A : Billes de myosines II, n= 1097. B : Billes de myosines V, n= 205. Les lignes de nucléation sont indiquées en vert. L'analyse ne prend en compte que les parties mobiles des trajectoires. La distribution en pointillé rouge correspond aux positions des billes lorsqu'elles apparaissent dans le réseau. La distribution en noir est obtenue en ne prenant en compte que les trajectoires qui durent plus de 200 s et en relevant la position de ces billes de t= 200 s à la fin de leurs trajectoires ; il s'agit d'une estimation de la distribution de position des billes à l'état stationnaire (voir Matériel et Méthodes page 71). La distribution en vert est estimée à partir des profils de vitesse et de diffusion, en supposant que le mouvement des billes obéit à un processus de convection-diffusion (voir page 76).

Le pic de la distribution de position des billes couvre une zone où le gradient des vitesses et le coefficient des vitesses sont quasiment uniformes. Par voie de conséquence, les distributions sont décrites par des Gaussiennes desquelles il est possible extraire un écart type $\sigma = \sqrt{D(0)/v'(0)}$ par rapport à la position moyenne des billes (x= 0). Cet écart type caractérise la précision du phénomène de centrage ; plus il est faible, plus le positionnement des billes est précis. Plus le gradient des vitesses est grand, plus le centrage des billes est précis. Nous pourrions alors penser que la myosine II centre mieux que la myosine V, mais ce n'est pas le cas car la plus grande diffusion des billes-myosines II fait plus que compenser l'effet du gradient des vitesses. Il en résulte que c'est la myosine V, le moteur le plus lent mais aussi le moins 'bruité', qui centre le mieux son cargo. L'écart type de la position des billes par rapport au centre est de 3,3 ±0,6 µm pour les billes-myosines V et de 4,1 ±0,3 pour les billes-myosines II, ce qui correspond à une augmentation de 28,5% (Figure 83). Le test-t-student bilatéral indique que cette différence est significative (p= 0,005).

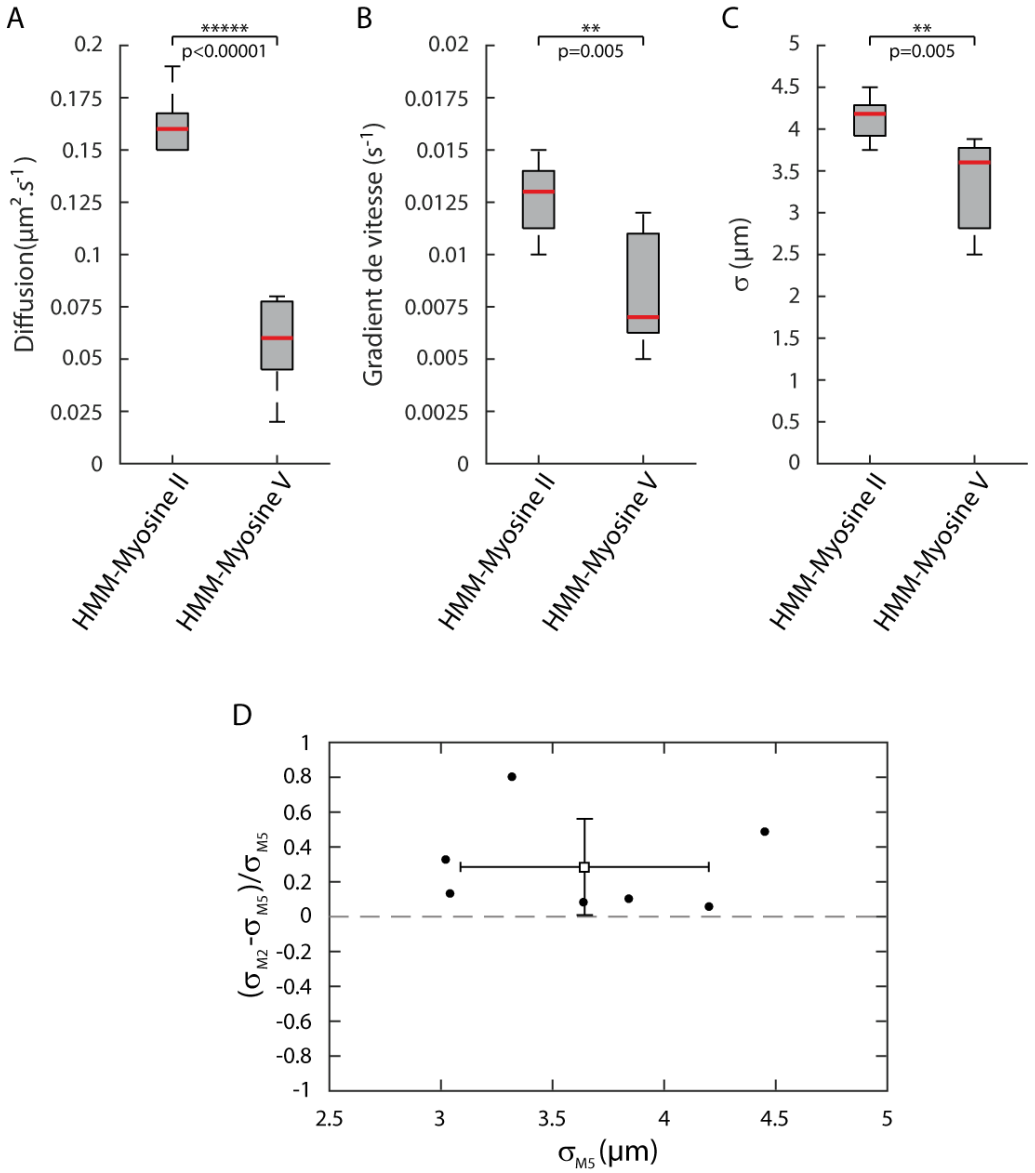


Figure 83 : Comparaison entre les propriétés des billes-myosines II et des billes-myosines V lorsqu'elles évoluent dans un même réseau antiparallèle d'actine (n= 7). A : coefficient de diffusion au centre du réseau. Valeurs médianes : $D_{EFF}(0)$= 0,16 µm²/s pour la myosine II ; $D_{EFF}(0)$= 0,06 µm²/s pour la myosine V. B : gradient de vitesse au centre du réseau. Valeurs médianes : $\partial_x V_{EFF}(0)$= 0,013 s^{-1} pour la myosine II : $\partial_x V_{EFF}(0)$= 0,007 s^{-1} pour la myosine V. C : écart type de la distribution de position des billes. Valeurs médianes : σ= 4,1 µm pour la myosine II ; σ= 3,3 µm pour la myosine V. Les rectangles gris représentent les données entre le 25ième et le 75ième centile. Les barres en pointillé délimitent les extrema des données. En rouge sont indiquées les valeurs médianes. Les probabilités p correspondent aux résultats de test-t-student bilatéraux par la méthode de Welch. D : Différence de centrage entre les billes-myosines II et les billes-myosines V. En abscisse : écart type (STD) de la distribution de position des billes-myosines V. En ordonnée : différence relative entre les deux écarts types.

b.4 Effet des conditions initiales sur le centrage : quantité d'actine et taille (interligne) du réseau.

Le précision du centrage observé avec les billes-myosines II et V ne semble pas dépendre de la concentration initiale en monomères d'actine, du moins dans une gamme de 2 à 5 µM et avec un interligne de 40 µm sur le motif de nucléation

(Figure 84). Comme la concentration d'actine modifie la densité des filaments dans le réseau, mais pas leur longueur moyenne (Figure 57.A), cela signifie que la densité en filaments ne joue pas de rôle. Cela suggère que la densité est suffisament importante pour que la probabilité d'accrochage des billes aux filaments ne soit pas limitante.

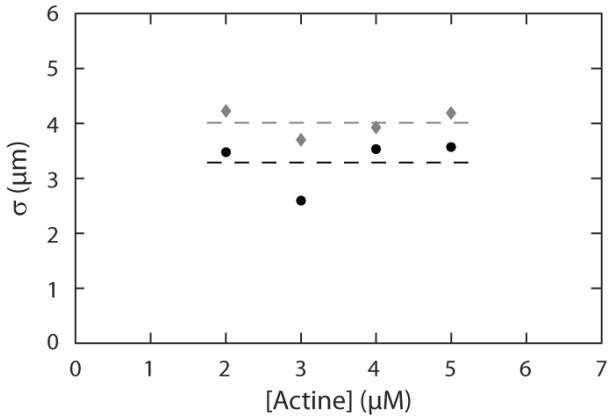


Figure 84 : Effet de la concentration initiale d'actine sur le centrage. Ecart type de la distribution de position des billes en fonction de la concentration d'actine monomérique initiale en solution. Losange : billes-myosines II. Cercle : billes-myosines V.

En augmentant l'interligne et en travaillant à une faible concentration d'actine (2 µM), il est évidemment possible d'appauvrir suffisamment le centre du réseau en actine pour que les filaments de polarité opposée s'enchevètrent peu. Ainsi, la distribution des billes qui résulte d'un transport dirigé vers le centre s'élargit (Figure 85). Dans ce cas, les billes n'interagissent pratiquement plus qu'avec un seul type de filament à la fois et nous retrouvons de chaque côté les caractéristiques du transport observées dans un réseau parallèle (Figure 75).

En accord avec une faible interaction des billes avec l'actine, l'anisotropie de diffusion au centre du réseau est petite (Figure 85 B et C). Néanmoins, elle ne disparaît pas totalement, laissant supposer qu'il demeure un faible enchevêtrement des filaments de polarité opposée. Avec les billes-myosines V, il est à noter que le coefficient de diffusion chute lorsque la zone étudiée se rapproche des lignes de nucléation et que la densité d'actine augmente ; les billes sont alors animées d'un mouvement dirigé très peu bruité. Avec les billes-myosines II, le profil de diffusion suivant l'axe des filaments conserve un (large) minimum au centre. Comme dans les réseaux parallèles (Figure 75), les profils de vitesse présentent un plateau à 80 $nm.s^{-1}$ (myosine II) et 50 $nm.s^{-1}$ (myosine V) près des lignes de nucléation. Il en résulte un centrage beaucoup moins précis, avec un écart type de 8,7 µm pour les billes-myosines II et de 7,5 µm pour les billes-myosines V. Pour rappel, les écarts type dans les réseaux antiparallèles denses étaient respectivement de 4,3 ±0,6 µm et de 3,6 ±0,9 µm.

Enfin, nous avons observé que si la concentration d'actine est suffisante (4 µM), le centrage de billes-myosines II ne dépend pas de l'interligne du motif de nucléation (Figure 86), c'est-à-dire de la taille du système. La précision relative du centrage augmente donc avec l'interligne : le rapport entre l'écart type σ de la distribution de position à l'état stationnaire et l'interligne diminue de 11% à 6%.

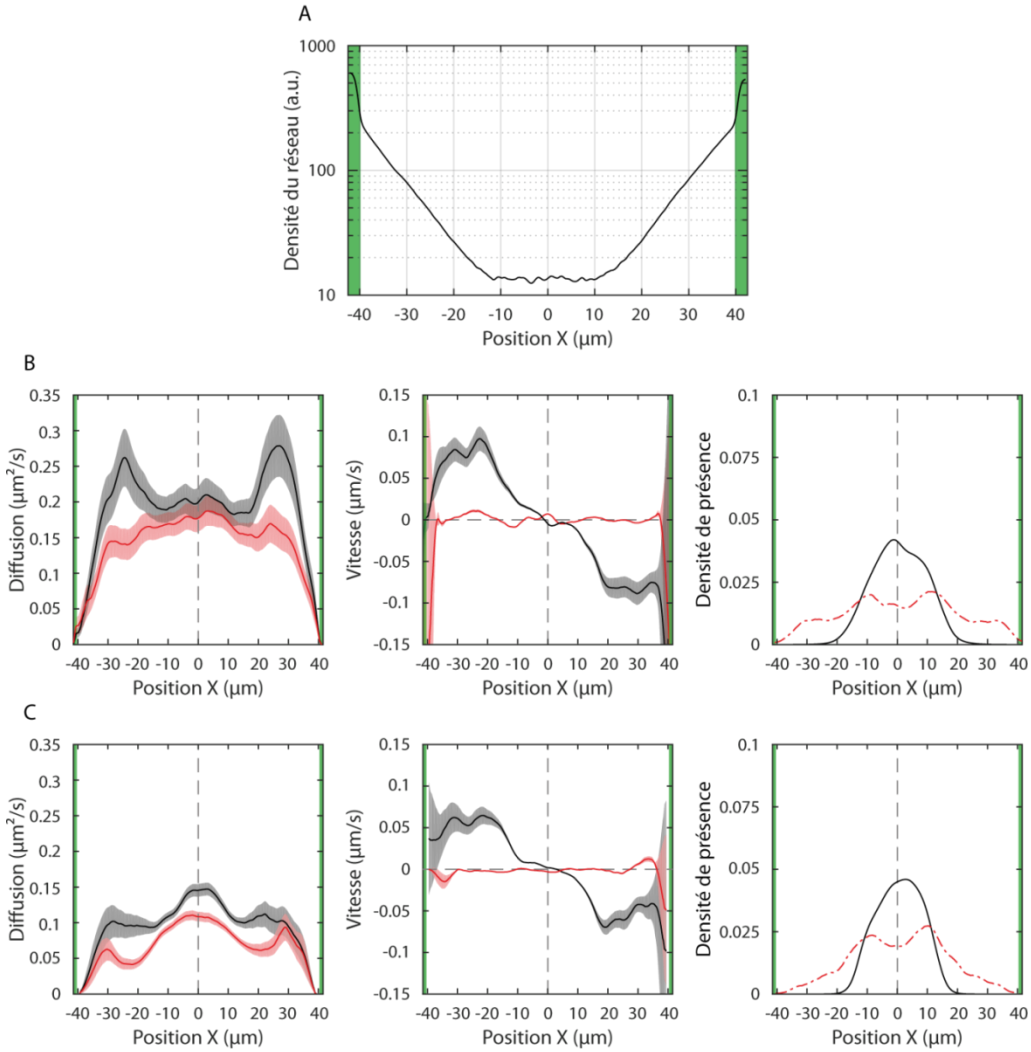


Figure 85 : Transport dans un réseau antiparallèle avec une très grande interligne (80 µm ; largeur des lignes de nucléation 3 µm) et avec une concentration en actine monomérique initiale relativement faible (2 µM). A : Profil de densité du réseau de filaments d'actine. Il est à noter que la densité d'actine au centre est si faible que le profil de fluorescence rentre dans le bruit du système d'acquisition. B et C : Profil de diffusion, profil de vitesse et distribution de positions des billes. B : Billes-myosines II, n= 1260. C : Billes-myosines V, n= 2415. Les lignes de nucléation sont indiquées en vert. L'analyse ne prend en compte que les parties mobiles des trajectoires. La distribution en pointillé rouge correspond aux positions des billes lorsqu'elles apparaissent dans le réseau. La distribution en noir est obtenue en ne prenant en compte que les trajectoires qui durent plus de 200 s et en relevant la position de ces billes à partir de t= 200 s jusqu'à la fin de leurs trajectoires ; il s'agit d'une estimation de la distribution de position des billes à l'état stationnaire (voir Matériel et Méthodes page 71). La distribution en vert est estimée à partir des profils de vitesse et de diffusion en supposant que le mouvement des billes obéit à un processus de convection-diffusion (voir page 76).

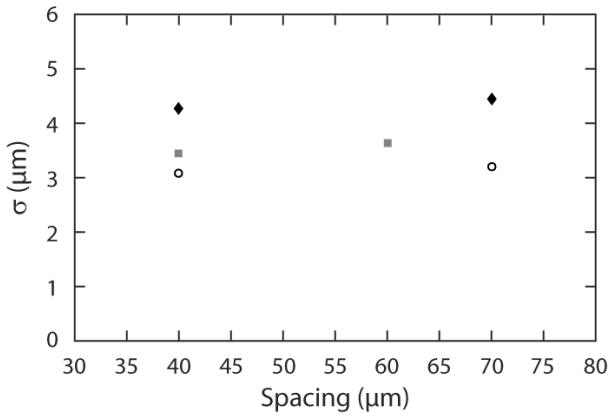


Figure 86 : Effet de l'interligne du motif de nucléation sur le centrage. Ecart type de la distribution de position des billes en fonction de l'interligne pour des billes de myosines II. Chaque symbole regroupe des expériences effectuées avec la même solution (n= 3). La concentration d'actine monomérique initiale est de 4 µM.

2. La myosine VI

a. Description qualitative des trajectoires

Le mouvement de la myosine VI étant dirigé vers le bout pointu du filament d'actine, nous nous attendons à ce que ce type de myosine (processive) transporte son cargo de la périphérie vers la ligne de nucléation. C'est effectivement le cas de la plupart des billes mobiles : elles démontrent un mouvement dirigé avec de très faibles fluctuations par rapport à l'axe principal du mouvement (Figure 87 : trajectoires noires), même si certains mouvements dirigés peuvent aussi être bruités (Figure 87 : trajectoire mauve). Il existe également des comportements plus complexes, comme de rares cas de déplacements bidirectionnels pour lesquels la bille semble capable de sauter de filaments de polarité donnée à des filaments de polarité contraire (Figure 87 : trajectoire bleue). Il est également possible d'observer des trajectoires diffusives qui ressemblent à celles obtenues en l'absence d'actine, peut-être parce que certaines billes n'ont pas reçu de moteurs ou sont couvertes par un trop faible nombre de moteurs (Figure 87 : trajectoires marrons).

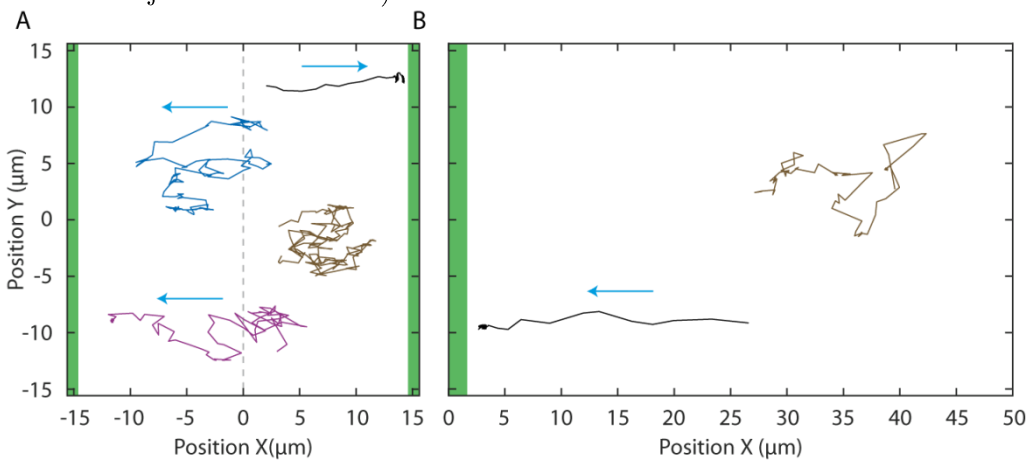


Figure 87 : Exemples de trajectoires des billes fonctionnalisées par la myosine VI. A : réseau antiparallèle, les lignes ont une largeur de 2 µm et sont espacées de 30 µm. B : réseau parallèle, la ligne a une largeur de 3 µm. Les lignes de nucléation (vert) sont espacées de 30 µm. Flèche (bleue) : sens de déplacement de la bille.

Dans un réseau antiparallèle de largeur L= 30 µm, les trajectoires qui présentent une longueur supérieure à 10 µm (suivant l'axe des filaments ; axe X) finissent aux abords d'une ligne de nucléation et ont une origine ne dépassant pas le milieu du réseau (x= 15 µm ; Figure 88.A). Certaines billes qui partent d'une distance de plus de 30 µm de la ligne de nucléation sont capables de venir s'y échouer (Figure 88.B). Ainsi, la longueur limitée des trajectoires dans le réseau antiparallèle (<L/2) est la conséquence de la coexistence de filaments de polarités opposées. Alors que les filaments d'actine sont assez longs pour aller d'une ligne de nucléation à l'autre, aucune bille ne traverse le réseau. Cette observation suggère que la polarité et la longueur du mouvement observé sont dictées par la polarité des filaments majoritaires à l'endroit où se trouve la bille. Il semble donc que les billes sondent régulièrement leur environnement.

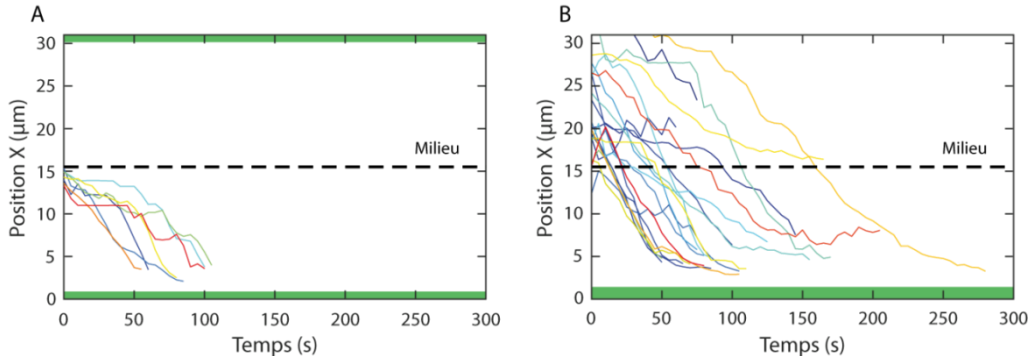


Figure 88 : Comparaison des trajectoires de billes-myosines VI. A : trajectoires dans un réseau antiparallèle formé à partir d'un ensemble de lignes de nucléation de 2 µm de largeur et espacées de 30 µm (vert). Les trajectoires sont repliées de telle manière que leurs positions finales soient comprises dans la même demi-période (ici entre x= 0 et 15 µm). B : trajectoires dans un réseau parallèle polymérisé à partir d'une ligne de nucléation (bordure du motif) de 3 µm de largeur (vert). En pointillé noir : position du milieu du réseau antiparallèle. Seules les trajectoires dont la longueur excède 10 µm sont considérées**.** L'abscisse 0 correspond au centre d'une ligne de nucléation.

b. Analyse globale et locale des mouvements

Comme pour les billes-myosines II et V (Figure 78), le mouvement quadratique moyen (MSD) de l'ensemble des billes caractérise l'activité des myosines (Figure 89). En effet, quand elle est tracée en échelle log-log, la relation entre le MSD mesuré suivant l'axe des filaments et le temps présente une pente supérieure à 1 (pente de 1,2) que cela soit dans le réseau antiparallèle ou parallèle, alors que le MSD mesuré suivant l' axe perpendiculaire décrit un comportement diffusif (pente 1). Les mouvements sont également beaucoup plus prononcés suivant l'axe des filaments (axe X) que perpendiculairement (axe Y) avec un rapport d'anisotropie clairement supérieur (~5) à celui observé avec les billes passives (~2,5), surtout à temps longs.

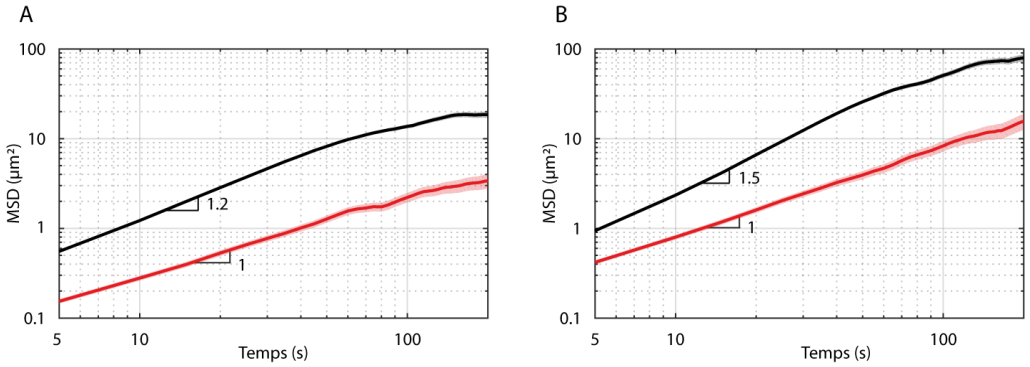


Figure 89 : Déplacement quadratique moyen de l'ensemble des billes fonctionnalisées par la myosine VI. En noir : MSD suivant l'axe des filaments (axe X). En rouge : MSD suivant l'axe orthogonal (axe Y). A : réseau antiparallèle polymérisé à partir d'un ensemble de lignes parallèles de 2 µm de largeur et espacées de 30 µm, n= 103. B : réseau parallèle polymérisé à partir d'une ligne parallèle de 3 µm de largeur, n= 52.

Le profil des coefficients de diffusion suivant l'axe des filaments (axe X ; Figure 90) présente un minimum local au milieu du réseau antiparallèle mais est uniforme (en oubliant les effets de bord) suivant l'axe orthogonal (axe Y). Les valeurs sont plus faibles que dans le cas passif (Figure 74). De plus, les vitesses perpendiculairement à l'axe des filaments (axe Y) sont nulles, ce qui confirme que l'activité des moteurs n'intervient pas dans cette dimension. Suivant l'axe des filaments, il existe une vitesse locale atteignant un maximum d'environ 80 nm.s^{-1} dans le cas d'un réseau parallèle et 50 nm.s^{-1} dans le cas d'un réseau antiparallèle. Au centre du réseau antiparallèle, la vitesse est nulle et change de signe ; elle varie linéairement avec la position sur l'intervalle X= ±5 µm. L'évolution temporelle de la distribution des billes dans le réseau démontre clairement l'accumulation des billes autour des lignes de nucléation, ce qui est le résultat du transport actif des billes par la myosine VI.

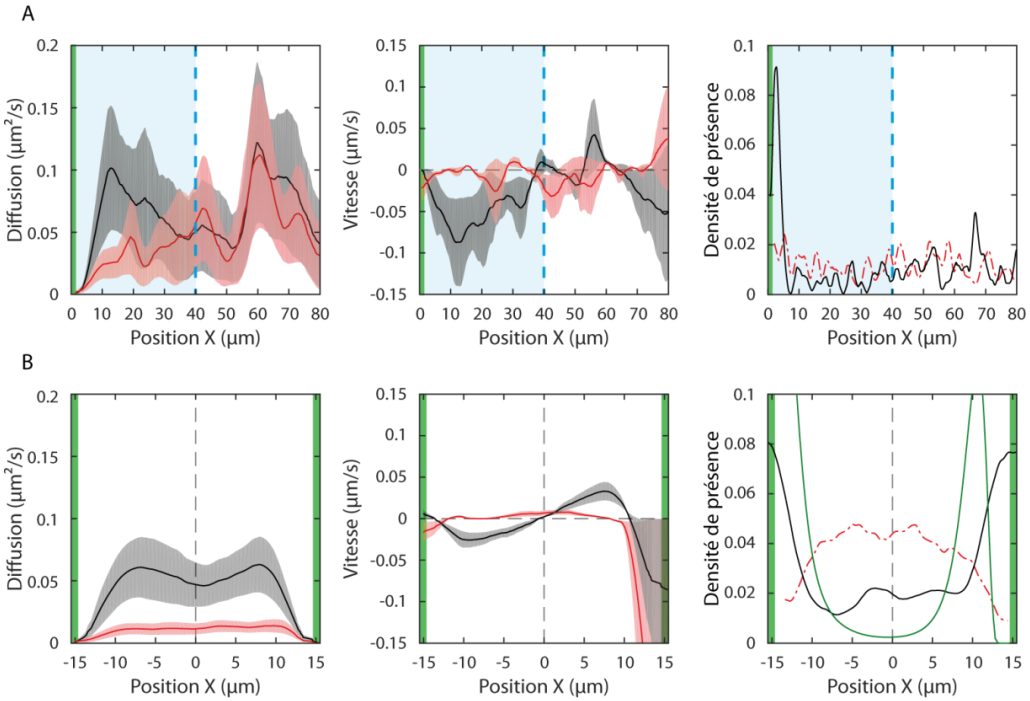


Figure 90 : Diffusion, vitesse et distribution des billes-myosines VI. A : Réseau parallèle et sans réseau, n= 52. B : Réseau antiparallèle, n= 103. Les lignes de nucléation sont indiquées en vert. La région bleue ciel délimite la zone d'influence du réseau parallèle

sur le mouvement des billes. L'analyse ne prend en compte que les parties mobiles des trajectoires. La distribution en pointillé rouge correspond aux positions des billes lorsqu'elles apparaissent dans le réseau. La distribution en noir est obtenue en ne prenant en compte que les trajectoires qui durent plus de 200 s et en relevant la position de ces billes de t= 200 s à la fin de leurs trajectoires ; il s'agit d'une estimation de la distribution de position des billes à l'état stationnaire (voir Matériel et Méthodes page 71). La distribution en vert est estimée à partir des profils de vitesse et de diffusion en supposant que le mouvement des billes obéit à un processus de convection-diffusion (voir page 76).

Comme pour les billes-myosines II et les billes-myosines V, les vitesses moyennes qui sont mesurées sur un ensemble de billes sont très inférieures aux vitesses obtenues dans un test de motilité (450 nm.s^{-1}, Figure 45, page 63). Ce résultat pourrait à nouveau indiquer que les billes ne sont pas toutes en interaction avec un réseau à chaque instant (décrochages fréquents), la vitesse moyenne mesurée est ainsi plus faible. En se concentrant sur les trajectoires longues et dirigées dans le réseau parallèle, il a été possible de mesurer des vitesses maximales allant jusqu'à 470 nm.s^{-1} (Figure 91). En moyenne, ces vitesses sont égales à 255 nm.s^{-1}, valeurs qui se rapprochent de celles obtenues dans un test de motilité. Ce résultat confirme que les moteurs fonctionnent normalement, mais qu'une moyenne d'ensemble sur des billes en mouvement (billes accrochées au réseau) et d'autres à l'arrêt peut être à l'origine des vitesses faibles. Comme dans le cas des billes-myosines II ou V étudiées dans la section précédente, un moyen de réconcilier ces observations serait que les billes se décrochent souvent de l'actine, diminuant ainsi la vitesse calculée lorsqu'une moyenne d'ensemble est faite sur les trajectoires d'un grand nombre de billes. Une autre possibilité serait que les billes soient soumises à une friction tellement importante que la vitesse des billes s'en trouve ralentie.

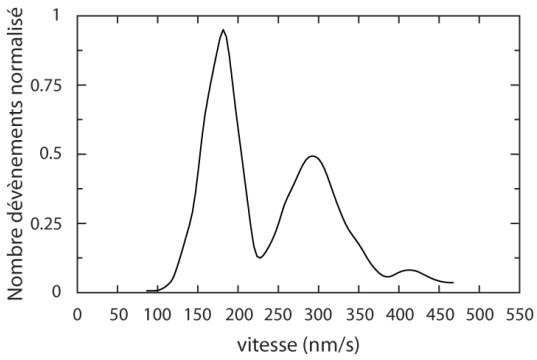


Figure 91 : Distribution des vitesses maximales dans le réseau parallèle de billes fonctionnalisées à la myosine VI. Seules les trajectoires explorant une distance supérieure à 10 µm le long de l'axe des filaments (axe X) ont été prises en compte (n= 21).

D Modèle à trois états

Le but de cette partie est d'apporter une explication à l'effet de centrage actif que nous avons observé expérimentalement lorsque des billes couvertes de myosines sont plongées dans un réseau antiparallèle d'actine. Nous cherchons en particulier à identifier les paramètres physiques qui contrôlent la distribution des billes à l'état stationnaire et à comprendre comment les propriétés des moteurs moléculaires et la structure du réseau de filaments d'actine influencent cette distribution. Le modèle a été développé à l'origine par Frank JÜLICHER (MPIPKS, Dresde) pour décrire le transport d'endosomes par la kinésine Klp98A dans le faisceau mitotique de cellules précurseurs des cellules sensorielles de la drosophile (Derivery et al). Le modèle considérait un réseau antiparallèle de microtubules, avec des densités de filaments uniformes pour chaque polarité et une zone de recouvrement au centre de la cellule. Nous l'avons généralisé au cas de réseaux de filaments inhomogènes, pour l'appliquer au cas particulier de profils de densité exponentiels que nous avons observé dans nos expériences. Les calculs détaillés et les simulations ont été effectués par Carles BLANCH MERCADER, un post-doctorant de l'UMR 168 qui travaille sous la direction de Jean-François JOANNY (ESPCI / UMR168) avec qui nous avons collaboré pour cette partie théorique. Nous avons également eu de nombreuses discussions avec Frank JÜLICHER.

1. Le modèle

Nous considérons un ensemble de filaments polaires (actine) alignés suivant l'axe X. Un filament aura une polarité définie comme positive si son bout barbé est dirigé dans le sens positif des abscisses x ; la polarité sera négative dans le cas contraire (Figure 92). Une bille couverte de moteurs moléculaires peut se trouver dans un des trois états suivants : un état accroché avec un filament de polarité positive (État 1), un état accroché avec un filament de polarité négative (État 2), ou un état décroché (État 3). Quand elle est accrochée, la bille se déplace à la vitesse +v (État 1) ou –v (État 2) vers le bout barbé du filament, alors qu'elle diffuse librement avec un coefficient de diffusion D dans l'état décroché (État 3). Les coefficients v et D sont des constantes. Le taux de détachement d'une bille (État 1 ou 2 → État 3), noté k_{off}, est également une constante, c'est-à-dire qu'il ne dépend pas de la position de la bille dans le réseau de filaments ni de la polarité du filament auquel elle est accrochée. En revanche, le taux d'accrochage d'une bille à un filament de polarité donnée (État 3 → État 1 ou 2) dépend de la densité locale du réseau (ρ_+ ou ρ_-) pour les filaments de cette polarité : il est égal à $k_{on}\,\rho_+$ pour l'accrochage aux filaments de polarité positive et à $k_{on}\,\rho_-$ pour les filaments de polarité négative, où k_{on} est une constante. C'est donc en se décrochant que la bille peut sonder son environnement et 'décider' si elle se raccroche à des filaments de polarité positive ou négative.

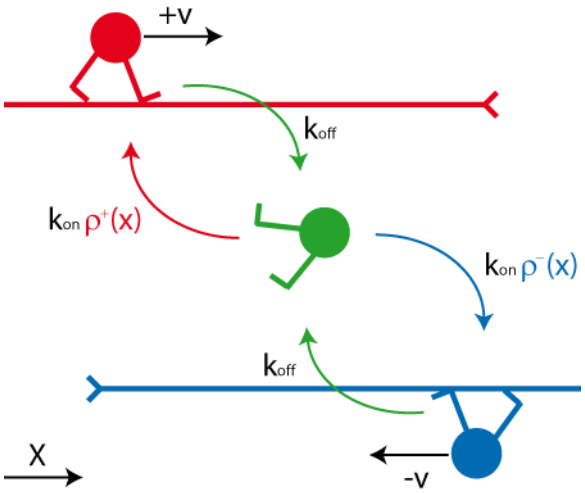


Figure 92 : Modèle à trois états du transport d'une bille-myosine dans un réseau antiparallèle de filaments d'actine. État 1 (rouge) : la bille est accrochée à un filament de polarité positive et se déplace à une vitesse +v. État 2 (bleu) : la bille est accrochée à un filament de polarité négative et se déplace à une vitesse –v. État 3 (vert) : la bille est décrochée du réseau et diffuse avec un coefficient de diffusion D. La bille se décroche d'un filament avec une constante cinétique k_{off} et s'accroche à un filament de polarité positive (respectivement négative) avec une constante cinétique $k_{on}\rho_{+}(x)$ (respectivement $k_{on}\rho_{+}(x)$) proportionnelle à la densité locale en filaments de cette polarité.

Pour chacun des trois états, nous introduisons une densité de probabilité de présence des billes à une position x et à un temps t, notées $P^{+}(x, t)$ pour l'état 1, $P^{-}(x, t)$ pour l'état 2 et $P_d(x, t)$ pour l'état 3. Compte tenu de nos hypothèses, les équations qui régissent la dynamique des billes s'écrivent :

$$\partial_t P^+ = -v\ \partial_x P^+ + k_{on}\rho^+ P_d - k_{off} P^+ \qquad \text{Eq. 50}$$

$$\partial_t P^- = v\ \partial_x P^- + k_{on}\rho^- P_d - k_{off} P^- \qquad \text{Eq. 51}$$

$$\partial_t P_d = D\ \partial_x^2 P_d + k_{off}\,(P^+ + P^-) - k_{on}(\rho^+ + \rho^-)\,P_d \qquad \text{Eq. 52}$$

La distribution de position des billes à un instant t $P(x, t) = P^{+} + P^{-} + P_d$ doit, de plus, satisfaire à la condition :

$$\forall t \in \mathbb{R}^+ : \int_{\infty} P(x,t)\,dx = 1 \qquad \text{Eq. 53}$$

Il est pratique d'introduire la densité totale de filaments d'actine $\rho = \rho^{+} + \rho^{-}$ et la différence de densité $\delta\rho = \rho^{+} - \rho^{-}$, une grandeur qui renseigne sur la polarité nette du réseau. Dans le cas particulier de profils exponentiels observés dans nos expériences (Figure 56, page 81), nous avons : $\rho(x) = \rho(0)\ \cosh(x/\lambda)$ et $\delta\rho(x) = \rho(0)\ \sinh(x/\lambda)$, où $\lambda \cong 8$ µm représente la longueur moyenne des filaments d'actine et $-L/2 < x < +L/2$ (L représente l'espacement entre les lignes de nucléation). L'origine des abscisses ($x = 0$) est prise à mi-distance des deux lignes de nucléation ayant permis de polymériser le réseau antiparallèle d'actine dans lequel sont plongées les billes. Nous définissons le 'paramètre d'ordre' $\phi(x) = \delta\rho(x)/\rho(x) = \tanh(x/\lambda)$, compris entre −1 et +1, pour ca-

ractériser la polarité nette du réseau. Nous avons $\phi \cong \pm 1$ pour $x = \mp L/2$, car une polarité domine aux bords du réseau.

2. Longueurs et temps caractéristiques, classification des comportements

En inspectant les équations Eq. 50, Eq. 51 et Eq. 52, nous nous rendons compte que le modèle présente deux temps caractéristiques : le temps moyen $\tau_{on}=1/k_{off}$ passé dans un état accroché (État 1 ou 2) et le temps moyen $\tau_{off}=1/(k_{on}\rho)$ passé dans l'état décroché (État 3). A partir de ces deux temps caractéristiques, il est possible de construire deux longueurs caractéristiques. Il y a tout d'abord la longueur 'balistique' $\ell_B=v/k_{off}=v\times\tau_{on}$ correspondant à la distance moyenne parcourue par une bille dans un état accroché à l'actine (État 1 ou 2). D'autre part, la longueur de diffusion $\ell_D=\sqrt{[D/(k_{on}\rho)]}=\sqrt{(D\times\tau_{off})}$ contrôle le déplacement quadratique moyen de la bille dans l'état détaché (État 3). Il est à noter que ℓ_D dépend de la position dans le réseau ; elle est maximale au centre, là où il y le moins d'actine, et minimale près des lignes de nucléation.

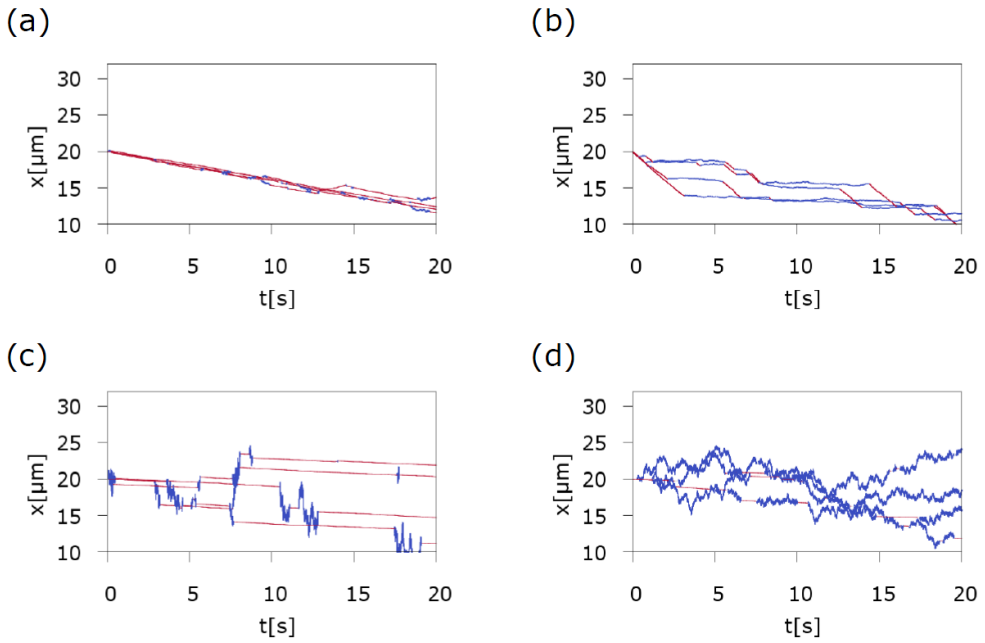


Figure 93 : Simulation de trajectoires individuelles dans quatre régimes de transport. A : Transport convectif ($\ell_B \gg \ell_D$ et $\tau_{on} \gg \tau_{off}$). Les billes se décrochent rarement et parcourent des distances beaucoup plus grandes lorsqu'elles sont accrochées (convection) que lorsqu'elles sont décrochées (diffusion). Le mouvement est dirigé vers le centre du réseau. B : Marche aléatoire biaisée ($\ell_B \gg \ell_D$ et $\tau_{on} \ll \tau_{off}$). Les billes se décrochent souvent mais parcourent des distances beaucoup plus grandes lorsqu'elles sont accrochées que lorsqu'elles sont décrochées C : Diffusion et pauses ($\ell_B \ll \ell_D$ et $\tau_{on} \gg \tau_{off}$). Les billes se décrochent rarement mais parcourent des distances beaucoup plus grandes dans l'état décroché (diffusion) que lorsqu'elles sont accrochées (convection de très faible vitesse), comme si les billes se collaient à l'actine. D : Exploration diffusive ($\ell_B \ll \ell_D$ et $\tau_{on} \ll \tau_{off}$). Les billes passent la plupart de leur temps décrochées et se déplacent peu pendant les rares évènements d'accrochage. Dans tous les cas, les billes sont positionnées en x= -20 µm à t= 0, où la polarité nette du réseau est positive ($\phi>0$). L'activité des moteurs tend donc à transporter les billes vers le centre (x= 0) où la polarité est nulle (ϕ= 0). Les portions de trajectoire pour lesquelles la bille est dans un état accroché sont marquées en bleu ; celles pour lesquelles la bille est décrochée sont marquées en rouge. Pour observer le détail des trajectoires, nous nous limitons ici à des simulations à temps courts (t<30 s).

Avec deux temps caractéristiques (τ_{on} et τ_{off}) et deux longueurs caractéristiques (ℓ_B et ℓ_D), nous obtenons quatre régimes de transport (Figure 93). Les trajectoires stochastiques de billes individuelles peuvent être simulées à partir de l'algorithme de Gillespie (Gillespie 1977). Nous observons qualitativement que les deux régimes dans lesquels la diffusion domine la convection ($\ell_D \gg \ell_B$) ne sont pas favorables au transport des billes de la périphérie vers le centre du réseau, contrairement à ce que nous observons dans nos expériences.

L'observation que le régime de forte diffusion ne conduit pas à un effet de centrage des billes dans le réseau antiparallèle est confirmée par des simulations sur des temps plus longs (Figure 96). Pour $\ell_B/\ell_D = 0{,}42$, la diffusion domine, et la distribution des billes est uniforme sur une large région du réseau (Figure 96.A-B). Au contraire, pour $\ell_B/\ell_D = 4{,}2$, un clair effet de centrage est observé ; les billes se positionnent prêt du centre du réseau (Figure 96.C-D). Pour des longueurs balistiques plus grandes ($\ell_B/\ell_D = 42$), l'effet de centrage est moins précis ; la distribution s'élargit. Ces observations suggèrent qu'il existe un optimum pour lequel les billes se positionnent en moyenne au centre du réseau avec une variance minimale.

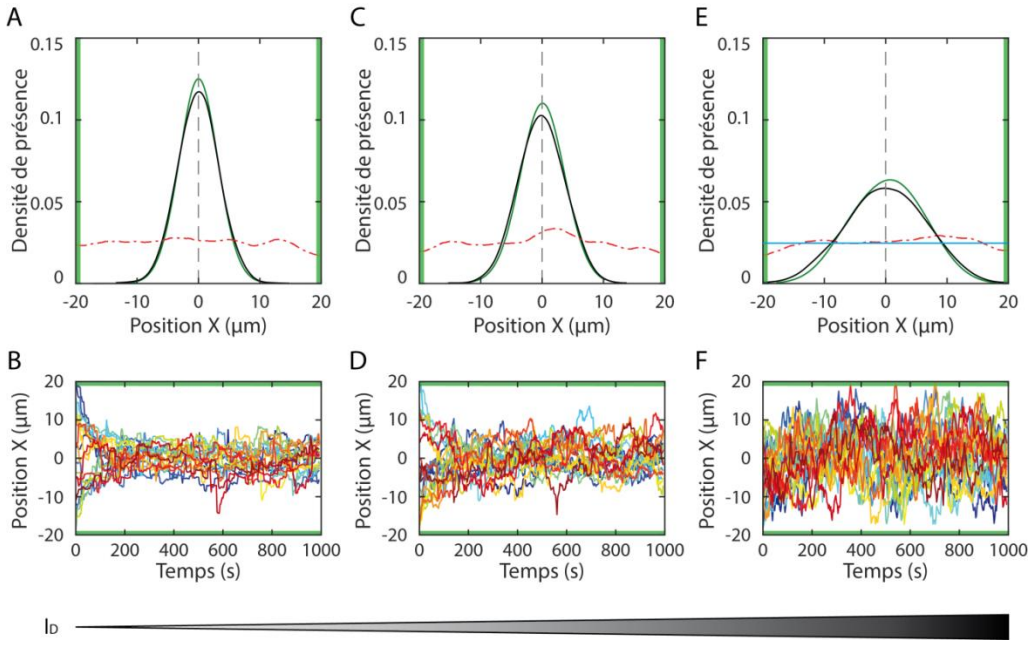


Figure 94 : Simulation des trajectoires et de la distribution de billes-myosines dans un réseau antiparallèle en fonction de la longueur balistique ℓ_B. Nous représentons sur la première ligne (A, C et E) la distribution des billes à l'instant initial (ligne pointillé rouge) et après 200 s de mouvement (ligne noire), lorsque les billes présentent une distribution stationnaire. Les graphes de la deuxième ligne (B, D et F) montrent les trajectoires correspondantes. A-B : ℓ_B= 0,125 µm (ℓ_B/ℓ_D = 0,42). C-D : ℓ_B= 1,25 µm (ℓ_B/ℓ_D = 4,2). E-F : ℓ_B= 12,5 µm (ℓ_B/ℓ_D = 42). Autres paramètres : ℓ_D(x= 0)=0,3 µm, k_{off}= 1,6 s^{-1} (τ_{on}= 0,625 s), $k_{on}\rho(0)$=0,04 s^{-1} (τ_{off}= 25 s), λ= 8 µm, L= 40 µm. Le centre du réseau (x= 0) est indiqué par une ligne en pointillé gris. Nombre de trajectoires simulées : 1000.

Nous avons confirmé l'existence d'un optimum de centrage en faisant varier systématiquement ℓ_B en gardant fixée la longueur de diffusion ℓ_D. La largeur de la distribution des billes à l'état stationnaire présente un minimum pour un rapport

ℓ_B/ℓ_D proche de 1 (Figure 95). Cet optimum du phénomène de centrage est observé quand ℓ_D et ℓ_B sont toutes deux très inférieures à la longueur moyenne λ des filaments d'actine et à la taille du réseau L. Curieusement, lorsque la longueur balistique devient comparable à la taille du réseau (L), la bille est capable de se déplacer d'un bout à l'autre du réseau avant de se décrocher d'un filament d'actine (Figure 96F). Il en résulte un va et vient entre les deux lignes de nucléation ; les billes ne sondent plus la densité locale du réseau et ne s'arrêtent donc pas au centre. Dans le cas extrême où le temps de transport entre les deux lignes serait négligeable devant le temps moyen passé dans l'état accroché τ_{on}, les billes passeraient la majeure partie de leur temps à attendre de se décrocher de l'actine aux deux extrémités du réseau. La distribution stationnaire des billes serait alors très piquée en x= $\pm L/2$, et la variance du mouvement dans ce cas limite ($\ell_B \to +\infty$) vaut $L^2/4$. Dans le cas où le réseau est très étendu par rapport à la longueur balistique ($L \gg \ell_B$), pour lequel les effets de bords sont négligeables, nous observons deux comportements asymptotiques simples. Pour $\ell_B \gg \ell_D$, la variance σ^2 de la position des billes croît proportionnellement à la longueur balistique : $\sigma^2 \propto \ell_B$. Dans la limite inverse, la variance décroît avec ℓ_B selon une loi de puissance : $\sigma^2 \propto (\ell_B)^{-0,8}$. La longueur balistique constitue donc clairement un paramètre de contrôle de la précision du phénomène de centrage.

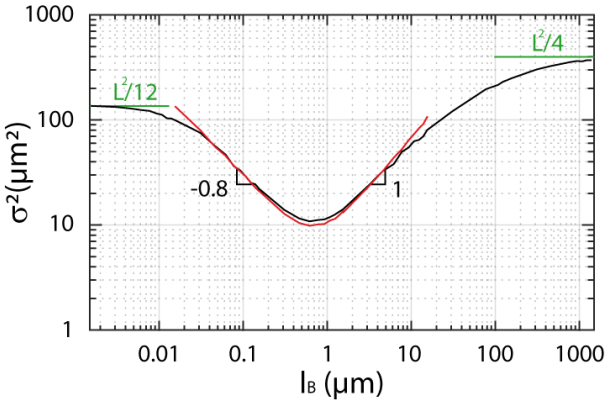


Figure 95 : Variance de la distribution des billes en fonction de la longueur balistique. Dans le cas d'un réseau de taille finie (L= 40 µm ; ligne noire), la variance du mouvement sature pour $\ell_B \to 0$ et pour $\ell_B \to +\infty$. Ces deux cas limites correspondent respectivement à de la diffusion libre dans une 'boîte' de taille L (distribution uniforme et variance $\sigma^2 = L^2/12$) et à des allers-retours à grande vitesse entre les deux lignes de nucléation avec un temps d'attente aux deux extrémités du réseau ($\tau_{on}+\tau_{off}$) qui est long par rapport au temps (L/v) du transport convectif (distributions piquées en x= $\pm L/2$ et $\sigma^2 = L^2/4$). Dans le cas d'un réseau infini ($L \to +\infty$), nous observons que $\sigma^2 \propto \ell_B$ pour $\ell_B \gg \ell_D$ (pente 1 sur le graphe) et que $\sigma^2 \propto (\ell_B)^{-0,8}$ pour $\ell_B \ll \ell_D$ (pente -0,8 sur le graphe). Autres paramètres : $\ell_D(x=0)$= 0,8 µm, k_{off}= 2,45 s^{-1} (τ_{on}= 0,41 s), $k_{on}\rho(0)$= 0,08 s^{-1} (τ_{off}= 12,5 s), λ= 8,7 µm.

A partir des trajectoires, nous pouvons calculer la vitesse locale $V_{EFF}(x)$ et le coefficient de diffusion local $D_{EFF}(x)$ des billes en fonction de leur position dans le réseau x (Figure 96), comme nous l'avons fait dans nos expériences (voir Chapitre II, page 74). Rappelons que si le transport des billes peut être décrit par un processus de convection-diffusion, alors la distribution stationnaire $P_{SS}(x)$ doit pouvoir se déduire des profils de vitesse et de diffusion suivant l'expression $P_{ss}(x) \propto \exp\left(\int_0^x V_{EFF}(x')/D_{EFF}(x')\,dx'\right)$ (voir page 76).

Dans le régime de forte diffusion (ℓ_B/ℓ_D = 0,42 ; Figure 96 A-C), nous observons un profil de diffusion concave avec un maximum au centre (x= 0). La distribution stationnaire des billes ne peut clairement pas être décrite par un simple processus de convection-diffusion. Par contre, lorsque la convection domine (ℓ_B/ℓ_D = 4,2 ; Figure 96 D-F), le profil de diffusion est convexe près du centre, avec un minimum local au centre. De plus, la distribution stationnaire coïncide avec la distribution calculée à partir des profils de vitesse et de diffusion ; le transport semble pouvoir être décrit par un processus effectif de convection-diffusion. Ces deux signatures sont observées expérimentalement pour les billes-myosines II et V (Figure 82, page 111). Nos simulations suggèrent donc que le régime de transport pertinent pour décrire nos expériences est tel que la convection par les moteurs dans les états accrochés domine la diffusion dans l'état décroché ($\ell_B > \ell_D$).

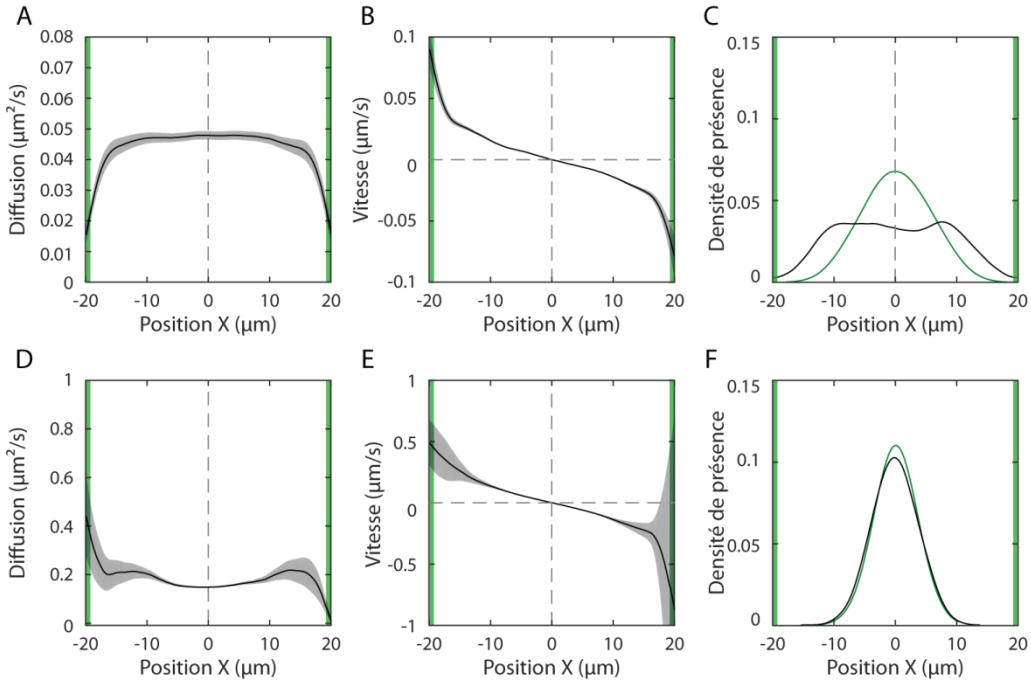


Figure 96 : Simulation des profils de vitesse et de diffusion, comparaison de la distribution des billes à celle résultant d'un processus de convection-diffusion. La distribution stationnaire des billes est tracée en noir ; la distribution stationnaire calculée à partir des profils de vitesse et de diffusion, en supposant que le transport des billes obéit à un processus de convection-diffusion, est tracée en vert. A-C : ℓ_B= 0,125 µm (ℓ_B/ℓ_D = 0,42). Mêmes trajectoires que pour les panels A et B de la Figure 94. D-F : ℓ_B= 1,25 µm (ℓ_B/ℓ_D = 4,2). Mêmes trajectoires que pour les panels C et D de la Figure 94. Autres paramètres : ℓ_D(x=0)= 0,3 µm, k_{off}= 1,6 s^{-1} (τ_{on}= 0,625 s), $k_{on}\rho(0)$= 0,04 s^{-1} (τ_{off}= 25 s), λ= 8 µm, L= 40 µm. Le centre du réseau (x= 0) est indiqué par une ligne en pointillé gris. Nombre de trajectoires simulées : 1000.

3. Approximation du transport à un processus de convection-diffusion, expressions analytiques de la vitesse et du coefficient de diffusion effectifs des billes

Dans la limite où la diffusion dans l'état décroché peut être négligée ($\ell_D \ll \ell_B$), nous allons montrer analytiquement que la dynamique du système peut être réduite à un processus effectif de convection-diffusion. Nous commençons par combiner les

équations Eq. 50, Eq. 51 et Eq. 52 pour utiliser P, $\delta P = P^{+} - P^{-}$ et P^{d} comme variables indépendantes :

$$\partial_t P = D\ \partial_x^2 P_d - v\,\partial_x \delta P \qquad \text{Eq. 54}$$

$$\partial_t \delta P = -v\ \partial_x P + v\ \partial_x P_d + k_{on}\delta\rho\ P_d - k_{off}\delta P \qquad \text{Eq. 55}$$

$$\partial_t P_d = D\ \partial_x^2 P_d - (k_{on}\rho + k_{off})\ P_d + k_{off} P \qquad \text{Eq. 56}$$

Dans la limite de faible diffusion ($\ell_D \ll \ell_B$), nous pouvons ignorer les termes proportionnels à D. Nous résolvons ce système d'équations pour obtenir une équation sur la seule variable P. Pour cela, nous utilisons la transformée de Laplace temporelle $\widetilde{P}(s) = \int_0^{+\infty} e^{-st}\, P(t)\, dt$ avec des transformées similaires pour les fonctions δP et P_d. Nous obtenons :

$$s\,\widetilde{P} = -v\,\partial_x \widetilde{\delta P} \qquad \text{Eq. 57}$$

$$s\,\widetilde{\delta P} = -v\ \partial_x \widetilde{P} + v\ \partial_x \widetilde{P_d} + k_{on}\delta\rho\ \widetilde{P_d} - k_{off}\ \widetilde{\delta P} \qquad \text{Eq. 58}$$

$$s\,\widetilde{P}_d = -(k_{on}\rho + k_{off})\ \widetilde{P}_d + k_{off}\ \widetilde{P} \qquad \text{Eq. 59}$$

où nous avons omis les conditions initiales car nous allons nous intéresser uniquement au comportement du système à temps longs. La troisième équation (Eq. 59) permet d'exprimer $\widetilde{P}_d$ en fonction de $\widetilde{P}$ puis, en injectant le résultat dans la deuxième équation (Eq. 58), $\widetilde{\delta P}$ en fonction de $\widetilde{P}$. Enfin, en utilisant l'équation Eq. 57, nous obtenons :

$$\begin{aligned} s\,\widetilde{P} = &-\frac{v}{s + k_{off}}\partial_x\left[\frac{k_{on}\delta\rho\, k_{off}}{s + k_{on}\rho + k_{off}}\,\widetilde{P}\right] \\ &+ \partial_{xx}\left[\frac{v^2}{s + k_{off}} \times \frac{s + k_{on}\rho}{s + k_{on}\rho + k_{off}}\,\widetilde{P}\right] \end{aligned} \qquad \text{Eq. 60}$$

Dans la limite des temps longs ($s \ll k_{on}\rho$ et $s \ll k_{off}$, équivalent à $t \gg \tau_{on}$ et $t \gg \tau_{off}$), nous pouvons prendre la transformée de Laplace inverse de l'équation Eq. 60 et obtenir une équation décrivant la dynamique de la densité de probabilité de présence P(x,t) :

$$\partial_t P = -v\ \partial_x\left[\frac{k_{on}\delta\rho}{k_{on}\rho + k_{off}} P\right] + \frac{v^2}{k_{off}}\partial_{xx}\left[\frac{k_{on}\rho}{k_{on}\rho + k_{off}} P\right] \qquad \text{Eq. 61}$$

Cette équation peut être mise sous la forme d'une équation de convection-diffusion

$$\partial_t P = -\,\partial_x[V_{EFF}(x)\ P - D_{EFF}(x)\,\partial_x P\,] \qquad \text{Eq. 62}$$

avec, respectivement, la vitesse effective V_{EFF} et le coefficient de diffusion effectif D_{EFF} :

$$V_{EFF}(x) = v\ (k_{on}\delta\rho)/(k_{on}\rho + k_{off}) - (v^2/k_{off})\ \partial_x[k_{on}\rho/(k_{on}\rho + k_{off})] \qquad \text{Eq. 63}$$

$$D_{EFF}(x) = (v^2/k_{off})\ [k_{on}\rho/(k_{on}\rho + k_{off})] \qquad \text{Eq. 64}$$

Il est à noter que le premier terme dans l'expression de la vitesse effective correspond simplement à la vitesse moyenne de la bille sur les deux états accrochés à l'actine : $V_{EFF} \cong (+v)P^+ + (-v)P^-$ où $P^+ = k_{on}\rho^+/(k_{on}\rho + k_{off})$ représente la probabilité que la bille se retrouve dans l'État 1 (vitesse +v) et $P^- = k_{on}\rho^-/(k_{on}\rho + k_{off})$ représente la probabilité que la bille se retrouve dans l'État 2 (vitesse −v). Le deuxième terme n'est significatif que si les billes évoluent dans un réseau inhomogène avec un gradient de densité sur une longueur caractéristique comparable ou supérieure à la longueur balistique $\ell_B = v/k_{off}$. Le coefficient de diffusion résulte de l'activité des moteurs sur la bille ; il est nul si v= 0. La stochasticité des évènements d'accrochage/décrochage de la bille à l'actine produit une marche aléatoire dont la longueur moyenne du pas est donnée par la longueur balistique ℓ_B. La durée moyenne entre deux pas est donnée par le produit du temps moyen $\tau_{on} = 1/k_{off}$ passé accroché à un filament d'actine par la probabilité d'être accroché (dans l'État 1 ou l'État 2).

Dans nos expériences, nous avons $\rho(x) = \rho(0)\ \cosh(x/\lambda)$ et $\delta\rho(x) = \rho(0)\ \sinh(x/\lambda)$, où λ désigne la longueur moyenne des filaments d'actine. Nous en déduisons une expression pour les profils de vitesse et de diffusion :

$$V_{EFF}(x) = -\,v \times \frac{\alpha \sinh(x/\lambda)}{1 + \alpha \cosh(x/\lambda)} \times \left(1 + \frac{\ell_B}{\lambda}\frac{1}{1 + \alpha \cosh(x/\lambda)}\right) \qquad \text{Eq. 65}$$

$$D_{EFF}(x) = \left(\ell_B^2\, k_{off}\right) \times \frac{\alpha \cosh(x/\lambda)}{1 + \alpha \cosh(x/\lambda)} \qquad \text{Eq. 66}$$

où $\alpha = k_{on}\ \rho(0)/k_{off} = \tau_{on}/\tau_{off}$ représente le rapport des deux temps caractéristiques du système. De plus, dans la limite $\ell_B \ll \lambda$ (raisonnable pour nos expériences, voir ci-dessous), l'expression de la vitesse effective se simplifie :

$$V_{EFF}(x) \cong -\,v \times \alpha \sinh(x/\lambda)/\left[1 + \alpha \cosh(x/\lambda)\right] \qquad \text{Eq. 67}$$

La distribution stationnaire $P = P_{SS}(x)$ des billes est alors donnée par :

$$P_{SS}(x) = P_0 \exp\left(\int_0^x \frac{V_{EFF}(x')}{D_{EFF}(x')}\, dx'\right) \cong P_0 \exp\left(\int_0^x \frac{\tanh(x'/\lambda)}{\ell_B}\, dx'\right) \qquad \text{Eq. 68}$$

Il est à noter que dans ce régime, la distribution ne dépend pas de $\alpha = (k_{on}\rho_0/k_{off}) \times \exp(-L/(2\lambda))$, et donc ne dépend ni de la densité ρ_0 d'actine sur les lignes de nucléation, ni de la taille L du système.

Près du centre ($x<0{,}7\ \lambda$ pour une erreur inférieure à 10%), $\tanh(x/\lambda) \cong x/\lambda$ et la distribution est décrite par une Gaussienne :

$$P_{SS}(x) \cong \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right) \qquad \text{Eq. 69}$$

avec la variance :

$$\sigma^2 = \lambda\, \ell_B \qquad \text{Eq. 70}$$

Les billes sont positionnées en moyenne au centre du réseau ($x= 0$), là où la polarité nette de l'actine est nulle ($\phi(x)= \delta\rho(x)/\ \rho(x)=\tanh(x/\lambda)$ est nul en $x= 0$) L'écart type σ caractérise la précision du centrage par le processus de convection-diffusion. Il s'exprime comme la moyenne géométrique de la longueur moyenne λ des filaments d'actine (une caractéristique de la structure du réseau d'actine) et de la longueur balistique ℓ_B (une caractéristique de l'activité des moteurs). La distribution de position des billes est donc bien influencée à la fois par la structure du réseau d'actine et par les propriétés des moteurs qui déplacent les billes. Il est à noter que $\lambda = 1/\partial_x\phi(0)$. Plus le gradient de polarité (nette) du réseau est important, plus le positionnement des billes sera précis. D'autre part, il est nécessaire que les billes sondent leur environnement pour déterminer la polarité locale du réseau $\phi(x)$, ce qu'elles font dans ce modèle en se décrochant et en se ré-accrochant à l'actine. Il semble alors naturel d'avoir une longueur balistique ℓ_B aussi faible que possible pour obtenir un centrage précis, en particulier que $\ell_B \ll \lambda$ pour 'sentir' les variations de polarité dans l'actine. Cependant, la longueur balistique ne peut pas être trop petite non plus, sinon la diffusion dans l'état décroché prendra le dessus et l'effet de centrage sera perdu (Figure 96). Dans la limite inverse ($\ell_B \gg \lambda$), la variance de la distribution est alors proportionnelle à λ^2 avec un préfacteur plus grand que 1. Ce cas ne correspond clairement pas à nos expériences, puisque nous trouvons un écart type inférieur à λ. D'ailleurs, pourrions-nous parler de 'centrage' si l'écart type autour de la position moyenne est plus grand que la longueur moyenne des filaments ?

Il existe alors une hiérarchie d'échelles de longueur :

$$L > \lambda > \ell_B > \ell_D \qquad \text{Eq. 71}$$

La largeur du réseau $L= 40$ µm est cinq fois plus grande que la longueur moyenne $\lambda \cong 8$ µm des filaments d'actine ; les billes opèrent bien dans un réseau antiparallèle inhomogène. De plus, la longueur balistique ℓ_B doit être très inférieure à L, car l'inverse conduirait à des mouvements d'aller-retour entre les lignes de nucléation, et également inférieure à λ, sinon les billes ne peuvent pas sonder la polarité locale du réseau (condition nécessaire à un 'centrage' ; voir ci-dessus). Enfin, le transport convectif doit dominer le transport diffusif ($\ell_B > \ell_D$) pour que le processus de transport puisse être décrit par un processus de convection-diffusion.

4. Valeur des paramètres

a. Taux d'attachement et de détachement pour les myosines II et V

Dans nos expériences, la distribution des billes estimée à l'état stationnaire est en accord avec celle calculée à partir des profils de vitesse et de diffusion, en supposant que le transport des billes obéit à un processus de convection-diffusion. Notre modèle suggère que c'est le cas lorsque la diffusion libre des billes est suffisamment faible pour que $\ell_B \gg \ell_D$. De plus, ce n'est que dans ce régime que le profil de diffusion est convexe près du centre, avec un minimum local (Figure 96), comme nous l'avons observé dans nos expériences (Figure 82). Nous nous plaçons donc dans le cadre de cette approximation. Par conséquent, nous approximons les profils de vitesse $V_{EFF}(x)$ et de diffusion $D_{EFF}(x)$ mesurés expérimentalement par les expressions analytiques données par les équations Eq. 66 et. Eq. 67 Nous considérons de plus que la vitesse v de la bille dans un état accroché à l'actine est donnée par la vitesse mesurée dans un test de motilité. La longueur moyenne des filaments d'actine λ est quant à elle déduite des profils exponentiels de densité mesurés expérimentalement. De plus, des profils $V_{EFF}(x)$ et $D_{EFF}(x)$, nous extrayons deux paramètres : la valeur $D_{EFF}(0)$ du coefficient de diffusion et la valeur $\partial_x V_{EFF}(0)$ du gradient des vitesses au centre du réseau (x= 0) (Tab. 11). Ces paramètres sont déterminés avec une bonne précision car les billes se concentrent au centre du réseau et les barres d'erreur sont donc petites à cet endroit.

Type de moteur	Valeurs expérimentales		
	Vitesse v dans un test de motilité (µm/s)	Coefficient de diffusion effective $D_{EFF}(0)$ (µm².s^{-1})	Gradient de vitesse effective $\partial_x V_{EFF}(0)$ au centre (ks^{-1})
Myosine II (n= 16)	2	0,13 ± 0,04	12 ± 2
Myosine V (n= 11)	0,46	0,06 ± 0,02	8,4 ± 2,5

Tab. 11 : Tableau récapitulatif des paramètres mesurés dans nos expériences. La longueur moyenne des filaments d'actine pour l'ensemble de ces expériences est λ= 7,9 ±1,3 µm.

Nous en déduisons (Eq. 72) des estimations des taux de détachement k_{off} et d'attachement $k_{on}\rho(0)$ des billes à l'actine, ainsi que de la longueur balistique ℓ_B (Eq. 72 et Tab. 12).

$$\partial_x V_{eff}(0) = -\frac{v}{\lambda}\frac{\alpha}{\alpha+1} \Rightarrow \alpha^{-1} = \frac{v}{\lambda\ \partial_x V_{eff}(0)} - 1 \qquad \text{Eq. 72}$$

$$D_{eff}(0) = \frac{v^2}{k_{off}}\frac{\alpha}{\alpha+1} \Rightarrow k_{off} = \frac{v^2}{D_{eff}(0)}\frac{\alpha}{\alpha+1} \qquad \text{Eq. 73}$$

$$k_{on}\rho(0) = \alpha\, k_{off} \Rightarrow k_{on}\rho(0) = \frac{v^2}{D_{eff}(0)}\frac{\alpha^2}{\alpha+1} \qquad \text{Eq. 74}$$

Type de moteur	Estimation			
	k_{off} (s^{-1})	$k_{on}\rho(0)$ (s^{-1})	α	ℓ_B (µm)
Myosine II (n= 16)	1,6 ± 0,6	0,08 ± 0,04	0,05 ± 0,04	1,25 ± 0,47
Myosine V (n= 11)	0,6 ± 0,3	0,1 ± 0,07	0,17 ± 0,02	0,77 ± 0,39

Tab. 12 : Estimation des paramètres de la bille : le taux de décrochage k_{off}, le taux d'accrochage $k_{on}\rho(0)$ au centre du réseau, le rapport $\alpha = k_{on}\rho(0)/k_{off} = \tau_{on}/\tau_{off}$ des temps moyens passés dans un état accroché (τ_{on}) et dans l'état décroché (τ_{off}), et la longueur balistique ℓ_B.

Il est à noter que nous trouvons $\ell_B \ll \lambda$, ce qui est en accord avec nos hypothèses.

b. De la bille aux moteurs : nombre de moteurs impliqués

Nous considérons qu'une bille se décrochera d'un filament lorsqu'il ne reste qu'un moteur accroché et que ce moteur se décroche. La loi de Poisson $p(n)=[(N_a)^n \times \exp(-N_a)]/n!$ permet d'exprimer la densité de probabilité p pour qu'il y ait n moteurs accrochés au filament étant donné un nombre moyen N_a de moteurs accrochés. Nous pouvons alors exprimer le taux de décrochage k_{off} d'une bille selon

$$k_{off} = k_{off}^{m}\, p(1) \qquad \text{Eq. 75}$$

où k_{off}^{m} est le taux de décrochage d'une myosine individuelle (HMM-II : 1000 s^{-1}, HMM-V : 10 s^{-1}). Cela conduit à l'expression :

$$k_{off} = k_{off}^{m}\, N_a\, e^{-N_a} \qquad \text{Eq. 76}$$

A partir des valeurs numériques de k_{off} (Tab. 12), nous estimons que les billes de myosines II ont approximativement 8,6 moteurs attachés en moyenne à chaque instant aux filaments d'actine alors que les billes de myosines V en ont 4,7 (Tab. 13). Ce nombre relativement faible permet aux billes de se décrocher souvent pour sonder la polarité nette du réseau et ainsi de se déplacer en fonction de cette polarité. A partir du rapport de charge r, il est possible d'estimer le nombre de moteurs N_i total sur la bille qui peuvent interagir avec l'actine (Eq. 77). Ainsi, les billes de myosines II (respectivement de myosines V) ont approximativement 344 (respectivement 7) moteurs en interaction avec le réseau de filaments d'actine (Tab. 13). Il est à noter que cette estimation donne un nombre beaucoup plus important de myosines II en interaction que de myosines V, ce qui est un peu mystérieux. Il semble que notre protocole de fonctionnalisation des billes soit plus efficace pour la myosine II que pour la myosine V.

$$N_i = \frac{N_a}{r} \qquad \text{Eq. 77}$$

Type de moteur	N_a	N_i
Myosine II	8,6	344
Myosine V	4,7	7

Tab. 13 : Nombre moyen de moteurs attachés à l'actine (N_a) et nombre de moteurs total (N_i) sur une bille.

5. Discussion

a. Surface d'interaction des billes de myosines II avec le réseau

Pour la myosine II, le nombre de moteurs par bille est estimé à 920 (voir page 59). Or seulement 344 moteurs sont en interaction avec les filaments d'actine. Ainsi, dans l'hypothèse d'une répartition uniforme des moteurs sur la bille, environ 28% de la surface de la bille est en contact avec le réseau. La longueur du cou de la myosine II est d'environ l_c= 7,5 nm (Ruff et al. 2001). De là, il est possible d'estimer la profondeur h de l'insertion de la bille dans le réseau (Figure 97), en supposant que tous les monomères d'un filament d'actine sont susceptibles d'interagir avec la myosine (pas de 'hot spot'). Les filaments d'actine ayant une longueur de persistance de 15 µm, ils se comportent comme des barreaux rigides à l'échelle de la bille de rayon R= 100 nm de diamètre. Le réseau d'actine autour de la bille peut être modélisé par un tube de rayon R tronqué par un plan parallèle à son axe et excentré de R-h (Figure 97). Ainsi, la surface du réseau en contact avec les moteurs de la bille est au maximum un tube de hauteur H (Eq. 78, Figure 97).

$$H = 2\sqrt{2Rl_c - l_c^2} = 76\ \text{nm} \qquad \text{Eq. 78}$$

Le ratio r_s entre la surface d'interaction et la surface totale de la bille est égal au ratio entre le nombre de moteur N_i en interaction avec le réseau et le nombre total N_t de moteur et vaut :

$$r_s = \frac{S}{4\pi R^2} = \frac{N_i}{N_t} \approx 0{,}37 \qquad \text{Eq. 79}$$

La surface d'interaction d'écrit comme :

$$S = \int_{-H/2}^{H/2} \text{acos}\left(\frac{R-H}{\sqrt{R^2-x^2}}\right)\sqrt{R^2-x^2}\ dx \qquad \text{Eq. 80}$$

Par résolution numérique nous trouvons que la hauteur d'immersion h est approximativement égale au diamètre de la bille. Autrement dit la bille est totalement immergée dans le réseau de filaments d'actine.

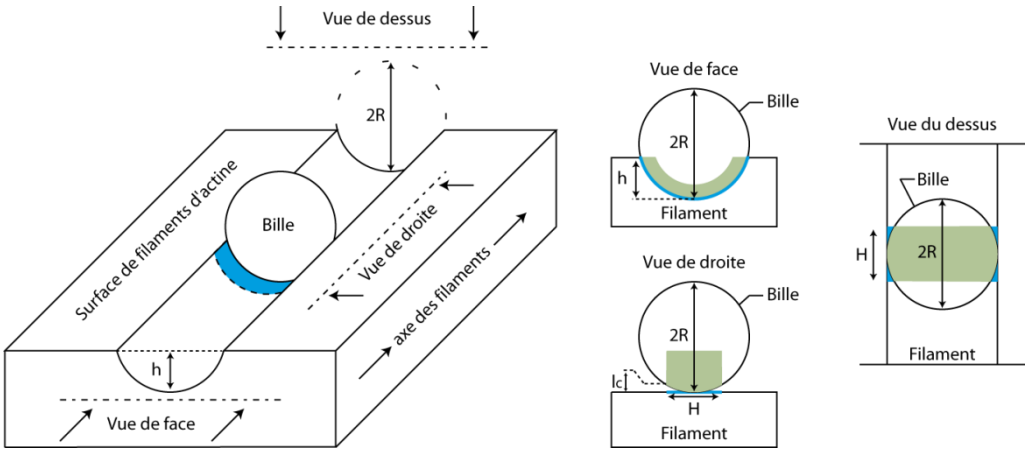


Figure 97 : Schéma d'une bille-myosines insérée dans le réseau d'actine sur une hauteur h. Les filaments étant rigides à cette échelle, l'enfoncement de la bille dans le réseau créé en première approximation une rigole. La surface de contact du réseau est représentée en bleu tandis que celle de la bille est représentée en vert.

b. Limites du modèle

Les profils de vitesse effective (Eq. 68) et du coefficient de diffusion effectif (Eq. 67) que nous avons calculés dans l'approximation du transport des billes à un processus de convection-diffusion (limite $\ell_D \ll \ell_B$), décrivent correctement le comportement des billes au centre du réseau. En revanche, le modèle surestime la vitesse des billes et le coefficient de diffusion pour des estimations éloignées du centre ($|x| > 5$ µm ; Figure 98). Nous avons supposé que le taux d'accrochage des billes est proportionnel à la densité locale en filaments d'actine et qu'une bille qui s'accroche se déplace instantanément à la vitesse $\pm v$. Il est néanmoins est possible que le taux d'accrochage sature lorsque la densité d'actine devient trop importante ou qu'il y ait un délai minimal entre l'accrochage et la mise en mouvement de la bille. Il serait intéressant de suivre ces pistes pour améliorer le modèle, même si c'est le comportement des billes près du centre, là où le modèle est performant, qui détermine la distribution stationnaire des billes.

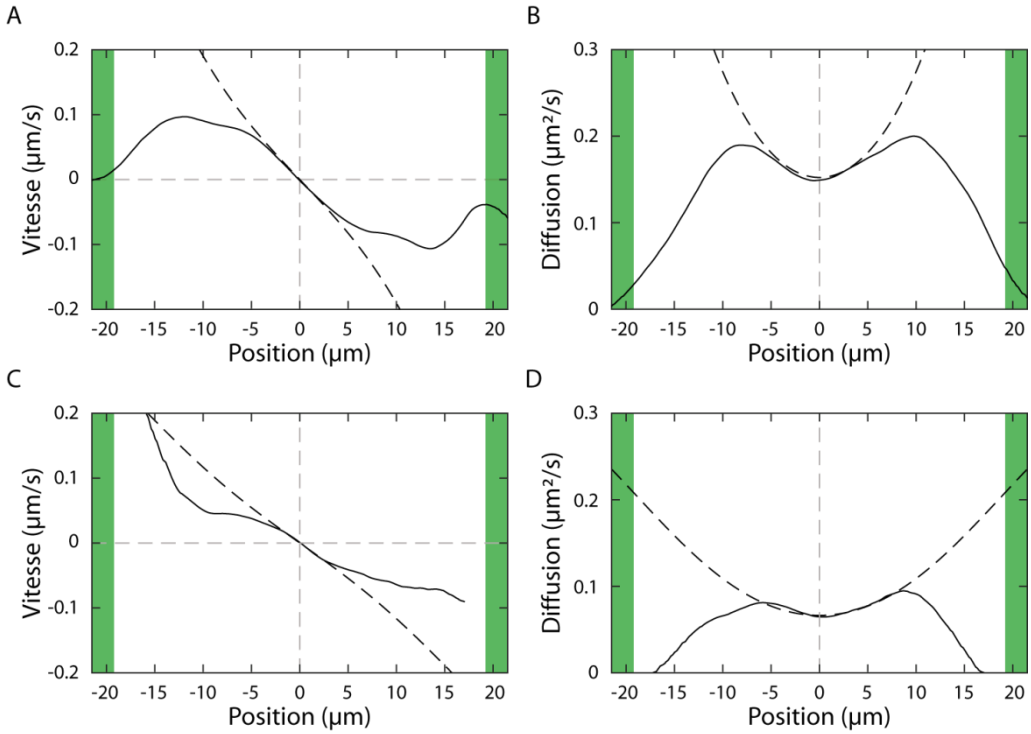


Figure 98 : Comparaison des profils de vitesse (A-C) et de diffusion (B-D) du modèle (--) avec les expériences (-) (voir Figure 82). A-B : billes-myosines II. C-D : billes-myosines V. Les lignes de nucléation sont en vert.

c. Trajectoires individuelles

Le modèle prédit (Tab. 11, page 53) que le système opère dans un régime où la convection par les moteurs dans l'état accroché domine la diffusion dans l'état décroché ($\ell_B \gg \ell_D$) et où le temps moyen passé dans l'état accroché est nettement plus court que celui passé dans l'état décroché ($\tau_{on} \ll \tau_{off}$). Les trajectoires devraient donc se composer de brèves sections dirigées à la vitesse v, interrompues par des pauses plus longues (régime de 'marche aléatoire biaisée' ; Figure 93B, page 121). La bille accrochée se déplace à une vitesse v sur une distance moyenne ℓ_B de l'ordre du micron pendant un temps moyen τ_{on} (myosine II : 0,6 s ; myosine V : 1,7 s), puis elle se décroche et diffuse librement pendant un temps moyen τ_{off} (myosine II : 12,5 s ; myosine V : 10 s) avant de se ré-accrocher (Figure 99). Dans nos expériences, nous avons utilisé un échantillonnage temporel du mouvement des billes avec un pas de 3 s $>\tau_{on}$, ce qui devrait entraîner une sous-estimation de la vitesse v (Figure 99 courbe bleue). Cela pourrait expliquer pourquoi les vitesses maximales mesurées le long de trajectoires dirigées (Figure 76, page 105) demeurent inférieures aux vitesses observées dans un test de motilité. De plus, la longueur balistique ($\ell_B \cong$ 1 µm) est du même ordre de grandeur que la précision de la mesure de la position d'une bille (0,6 µm). Les sections dirigées du mouvement sont ainsi noyées dans le bruit, et donc difficilement identifiables. Il serait souhaitable de répéter nos expériences avec de meilleures résolutions temporelle et spatiale pour vérifier que la forme des trajectoires est conforme à la prédiction théorique.

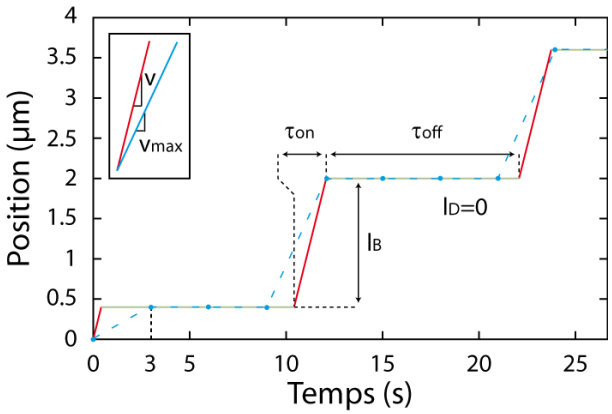


Figure 99 : Représentation d'une trajectoire de billes-myosines V prédite par le modèle à trois états. La bille est en interaction avec des filaments d'actine qui ont tous la même polarité, ce qui conduit à un transport vers les positions positives. En rouge : La bille est accrochée au réseau de filaments. En vert : La bille est décrochée. En bleu : Echantillonnage lors de l'acquisition des images toutes les 3 secondes. La longueur de diffusion ℓ_D est nulle et la longueur balistique vaut ℓ_B= 0,77 µm. Autres paramètres : voir Tab. 11 et Tab. 12, page 53).

d. Positionnement des billes dans un réseau asymétrique

Le modèle à 3 états prédit que le positionnement des billes dépend de la structure du réseau d'actine. Pour tester cette prédiction, nous avons essayé de briser la symétrie miroir du réseau antiparallèle par rapport à la ligne médiane d'un couple de lignes de nucléation, en utilisant des lignes de largeurs différentes (3 µm et 6 µm). Dans de rares cas, nous avons réussi à générer un réseau d'actine asymétrique (Figure 100). Dans l'exemple de la Figure 100, la ligne la plus large (6 µm) produit un profil exponentiel de densité d'actine avec une longueur moyenne des filaments λ^+= 7 µm, tandis que pour la ligne la plus fine (3 µm) la longueur moyenne de filaments est plus grande avec une valeur de λ^-= 11 µm. De plus, la densité d'actine sur la ligne la plus large est deux fois et demie plus importante que sur la ligne la plus fine. Malgré cette asymétrie, la distribution des billes dans le réseau reste symétrique (Figure 100.A). Ce résultat est décevant mais n'est pas en contradiction avec le modèle ; l'asymétrie reste en fait insuffisante pour que la déformation et le décentrage de la distribution des billes soient significatifs (Figure 100.B). Le modèle prédit que le pic de la distribution doit être localisé à la position x^* où la polarité moyenne du réseau d'actine est nulle : $\rho^+(x^*)=\rho^-(x^*)$. Pour un réseau asymétrique, la position x^* s'exprime comme :

$$x^* = \frac{L}{2} \times \left[\left(\frac{1}{\lambda^+} - \frac{1}{\lambda^-}\right) + \mathrm{Ln}\left(\rho^+\left(-\frac{L}{2}\right)/(\rho^-\left(+\frac{L}{2}\right)\right)\right] \Big/ \left(\frac{1}{\lambda^+} + \frac{1}{\lambda^-}\right) \qquad \text{Eq. 81}$$

où $\lambda^\pm$ représente les longueurs moyennes des filaments des réseaux de densité $\rho^\pm$. Dans notre cas, l'effet de la différence de densité sur les lignes de nucléation sur x^* est malheureusement compensé par l'effet de la différence de longueur moyenne des filaments. Il n'en reste pas moins qu'une structure asymétrique du réseau d'actine peut en principe conduire à une distribution décentrée et asymétrique des billes (Figure 100.C).

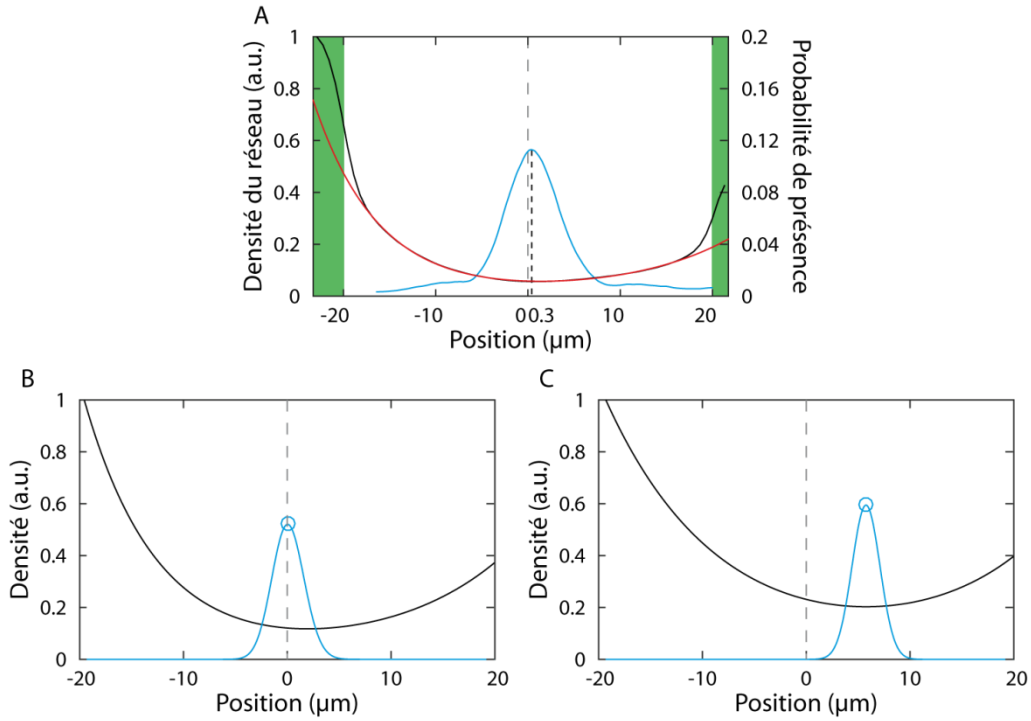


Figure 100 : Transport de billes-myosines V dans un réseau antiparallèle asymétrique. A : Résultat expérimental. Le profil de densité du réseau de filaments d'actine est en noir. Son ajustement par une somme de deux exponentielles (une croissante, l'autre décroissante) est en rouge. Les lignes de nucléation sont espacées de L= 40 µm et indiquées en vert. La ligne de nucléation de gauche est large de 6 µm et développe un réseau exponentiel $\rho_+(x)$ de longueur caractéristique de λ_+= 7 µm, tandis que la ligne de droite est large de 3 µm et développe un réseau exponentiel $\rho_-(x)$ de longueur caractéristique de λ_-= 11 µm. La densité sur la ligne la plus large ($\rho_+(-L/2)$ est deux fois et demie plus importante que sur l'autre ($\rho_-(+L/2)$). L'analyse ne prend en compte que les parties mobiles des trajectoires. La distribution en bleu (n= 175) est obtenue en ne prenant en compte que les trajectoires qui durent plus de 200s et en relevant la position de ces billes de t= 200 s à la fin de leurs trajectoires ; il s'agit d'une estimation de la distribution de position des billes à l'état stationnaire (voir Matériel et Méthodes). La position moyenne des billes est approximativement à mi-distance des bords des deux lignes de nucléation. B : Distribution de billes prédite par le modèle à 3 états (bleu) pour un profil d'actine similaire à celui présenté en A (noir). Le modèle prévoit que la distribution des billes est maximale à la position x^* où la polarité nette du réseau est nulle, c'est-à-dire où $\rho_+(x^*)= \rho_-(x^*)$. Le calcul donne : x^*= 0,3 µm, comme observé dans les expériences (A). C : Exemple de profil asymétrique d'actine (noir) pour lequel le modèle prédit un décentrage et une asymétrie significatifs de la distribution des billes (bleu). λ_+= 4 µm, λ_-= 15 µm, mêmes densités en x= ±L/2 qu'en B.

Il est à noter que le processus de division cellulaire asymétrique observé chez la drosophile repose sur l'existence d'un faisceau mitotique asymétrique (Derivery et al. 2015). Bien que dans ce cas les protéines en jeu soient complètement différentes (microtubules, moteurs kinésines) de celles qui nous intéressent ici (actine et moteurs myosines), la physique du modèle de transport à 3 états est générale. Par ailleurs, ce modèle a été proposé à l'origine par F. JÜLICHER pour expliquer pourquoi des endosomes transportés activement vers le centre du faisceau mitotique peuvent se répartir de manière asymétrique entre les deux cellules filles.

Chapitre IV

Réorganisation d'un réseau de filaments d'actine sous l'action de myosines en solution : oscillations de flagelles d'actine

Outre l'étude du transport de cargos (billes) par de petits groupes de myosines dans un réseau de filaments d'actine d'architecture contrôlée qui a été décrite dans le chapitre précédent, ce travail de thèse s'est également intéressé aux effets de l'activité mécanique de myosines mises en solution sur l'architecture du réseau. Dans le cas des myosines II et VI, le groupe de Laurent Blanchoin avait observé une contraction des zones antiparallèles et branchées du réseau, qui s'accompagnait d'une dépolymérisation de l'actine ainsi mise sous contrainte (Reymann et al. 2012). Aucune contraction n'est obtenue en présence de la HMM-II ou de la HMM-V. Néanmoins, de façon tout à fait inattendue, nous avons observé que la HMM-II et la HMM-V favorisent l'auto-assemblage de filaments parallèles en faisceaux oscillants, à la manière du flagelle du spermatozoïde. Les résultats présentés ici sont préliminaires. Ce chapitre est organisé comme suit. Nous allons présenter tout d'abord les différents types de réseaux d'actine employés. Puis, dans une expérience de contrôle, nous allons comparer les observations de contractilité de ces réseaux en présence de la myosine VI et les comparerons à la littérature. Pour finir, nous allons discuter des conditions d'apparition et des propriétés d'oscillations spontanées (battements) de faisceaux de filaments parallèles ancrés sur un motif de nucléation sous l'effet de l'activité de la HMM-II ou de la HMM-V.

A Les réseaux d'actine

Les réseaux d'actine sont polymérisés comme il a été décrit précédemment (voir page 51, même solution) mais les motifs de nucléation diffèrent. Pour cette étude, trois types de schéma 2D sont utilisés : premièrement un anneau large de 3 µm et d'un diamètre moyen allant de 30 à 60 µm (Figure 101.A) ; deuxièmement un disque de 60 µm de diamètre (Figure 101.B) ; troisièmement des lignes parallèles (Figure 101.C).

Dans le cas de l'anneau et du disque, les filaments d'actine présentent une organisation radiale. Au-delà des motifs, le bout barbé des filaments pointe vers l'extérieur. A l'inverse, à l'intérieur de l'anneau, le bout barbé pointe vers le centre. Enfin, dans le cas de lignes parallèles, le réseau est similaire à la description faite dans le chapitre précédent. Nous rappelons que sur la surface des motifs, le réseau est branché.

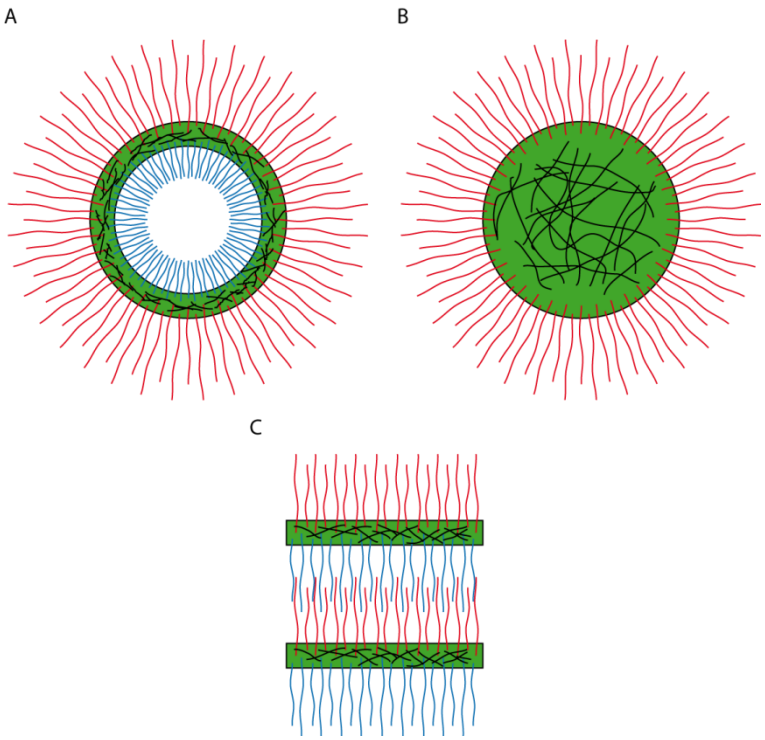


Figure 101 : Représentation schématique de réseaux de filaments d'actine polymérisés à partir de patrons 2D de pWA (vert). A : patron en forme d'anneau. En rouge : filaments radiaux dont le bout barbé pointe vers l'extérieur. En bleu : filaments radiaux dont le bout barbé pointe vers l'intérieur. En noir : réseau branché. B : patron en forme de disque. En rouge : filaments radiaux dont le bout barbé pointe vers l'extérieur. En noir : réseau branché. C : patron en forme de lignes parallèles. En rouge : filaments perpendiculaires aux lignes de nucléation dont le bout barbé pointe vers le haut. En bleu : filaments perpendiculaires aux lignes de nucléation dont le bout barbé pointe vers le bas. En noir : réseau branché.

B Contraction d'un réseau activée par la myosine VI

Comme contrôle, nous avons d'abord observé le comportement de réseaux de filaments d'actine en présence de 10 nM de myosine VI. Différents motifs de nucléation ont été utilisés, mais nous ne montrerons ici qu'un seul exemple illustratif. Le réseau est polymérisé à partir de deux lignes larges de 3 µm et espacées de 100 µm. L'activité mécanique de la myosine provoque trois processus consécutifs, comme il a été démontré précédemment par l'équipe de L. Blanchoin (Reymann et al. 2012). En premier lieu, le réseau se contracte à une vitesse de 4,3 µm.min^{-1} : la myosine VI se concentre sur le réseau branché présent sur les lignes de nucléation (Figure 102, t= 0 s) et le contracte ; le réseau ne reflète plus le motif de pWA présent initialement à la surface (Figure 102, t= 7 min 49 s). Au-delà d'une certaine contrainte, le réseau finit par dépolymériser (Figure 102, t= 23 min 27 s). En relâchant la contrainte de l'ancrage des filaments qui émergent des lignes de nucléation, cette dernière étape permet à la myosine VI de contracter ensuite le réseau antiparallèle situé entre les deux lignes. La myosine VI migre ainsi en ce lieu (Figure 102, t= 39 min 05 s).

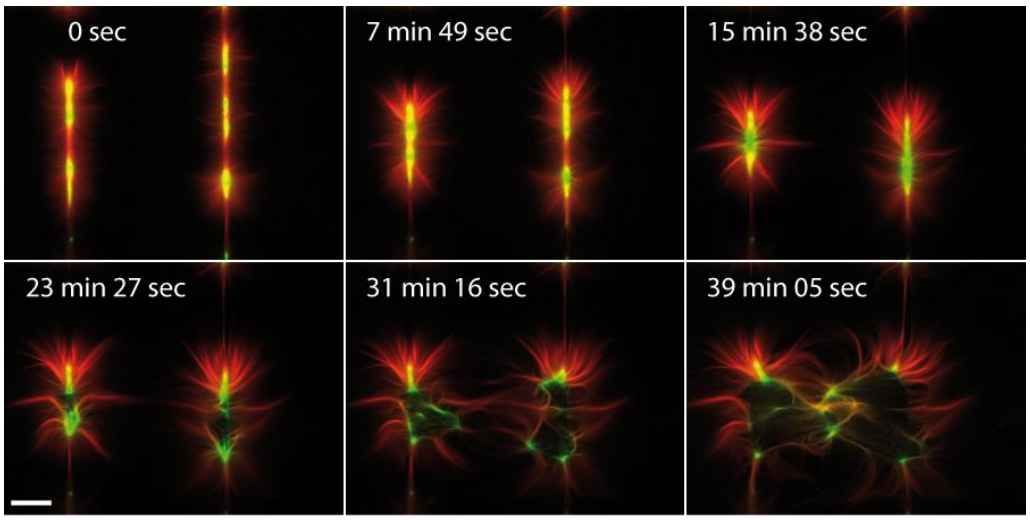


Figure 102 : Déformation et désassemblage de réseaux d'actine sous l'influence de myosines VI (vert). Le réseau de filaments d'actine (rouge) est polymérisé à partir de lignes de nucléation épaisses de 3 µm et espacées de 100 µm. La concentration d'actine est 2 µM pour 6 µM de profiline. Le pWA a été déposé avec une concentration de 1 µM et le complexe Arp2/3 en solution est de 10 nM. Echelle : 25 µm (Barre blanche). (Expérience réalisée avec l'aide d'H. Ennomanie)

C Auto-organisation et oscillations spontanées de flagelles d'actine

En présence de myosines II entières, capables de s'associer en filaments bipolaires de plusieurs dizaines de moteurs, l'équipe de L. Blanchoin a démontré que le comportement du réseau était globalement similaire à celui obtenu avec la myosine VI (Reymann et al. 2012). En revanche, en présence d'HMM-II ou d'HMM-V, les résultats diffèrent de manière impressionnante. Aucune ne contracte le réseau branché, mais ces moteurs ont la capacité de générer, dans les réseaux parallèles, des faisceaux de filaments parallèles oscillants à la manière de flagelles (Figure 103).

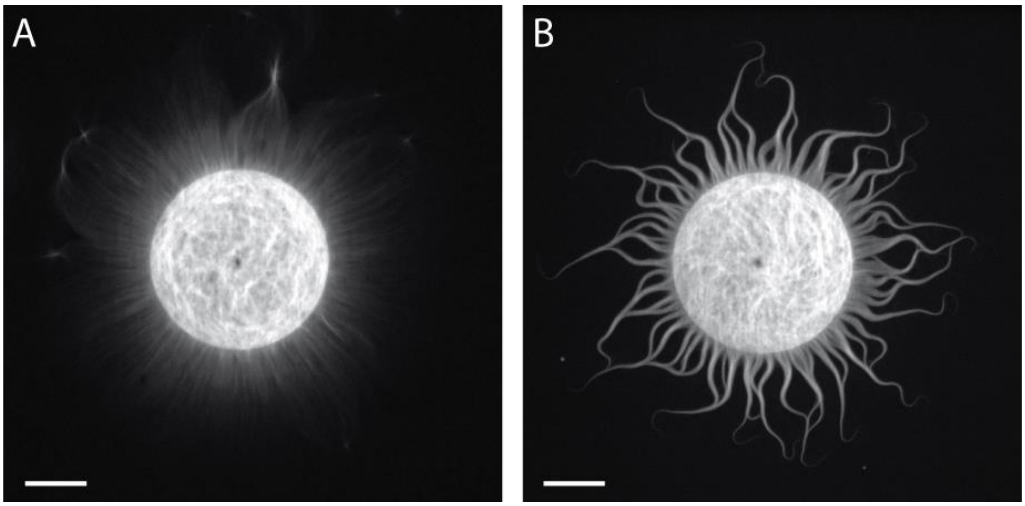


Figure 103 : Réseau de filaments d'actine après 50 min de polymérisation en l'absence (A) ou en présence (B) de 600 nM de HMM-II. Le réseau est polymérisé à partir d'un disque de nucléation large de 60 µm. Echelle 20 µm (Barre blanche).

1. Conditions d'existence et variation de la géométrie des flagelles

   a. Faisceaux précurseurs

Nous avons observé que des oscillations apparaissent seulement près des bords des chambres parallélépipédiques dans lesquelles sont placées nos solutions. Même sans myosine, une différence de structure du réseau est observée entre le centre de la chambre expérimentale et le bord (Figure 104). Aux bords, les filaments se regroupent davantage en faisceaux. Nous pensons que ce phénomène favorise l'apparition d'oscillations en présence de myosines. Actuellement, nous ne comprenons pas l'origine de cette différence d'organisation entre ces deux zones. La chambre est constituée de deux lames de verre espacées par du scotch double face. Il serait légitime de penser que le scotch est impliqué dans le phénomène. Cependant, le changement de son épaisseur ou son remplacement par du parafilm n'a eu aucune influence.

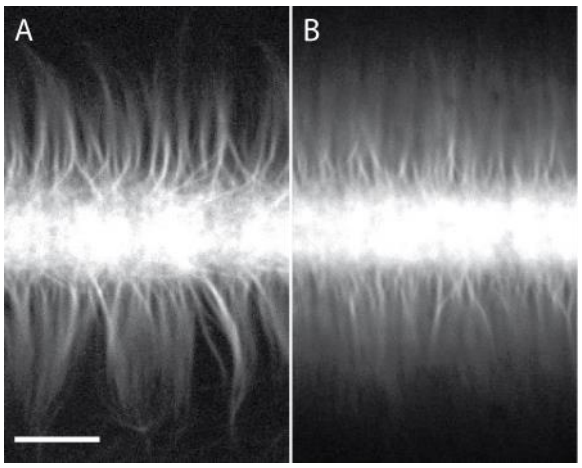


Figure 104 : Structure du réseau de filaments d'actine à proximité (A) **et loin** (>400 µm) (B) **du bord de la chambre expérimentale.** Echelle 10 µm (Barre blanche).

L'influence du bord sur la formation des faisceaux oscillants est graduelle. Pour caractériser l'effet de bord sur l'apparition de ces faisceaux, deux patrons de nucléations sont utilisés. Le premier est une ligne perpendiculaire aux bords (Figure 105) tandis que le second est constitué d'un ensemble de lignes parallèles aux bords, larges de 3 µm et espacées d'environ 50 µm (Figure 106). Près des bords, les faisceaux sont cohésifs et très bien individualisés ; les battements ressemblent à une onde progressive le long d'une corde (voir ci-dessous). Plus la fenêtre d'observation est éloignée du bord, plus les faisceaux d'actine sont diffus. Des oscillations continuent d'être observées, mais s'apparentent alors davantage à un mouvement de flamme. Au-delà d'une distance de 400 µm du bord, l'activité des myosines n'est plus perceptible.

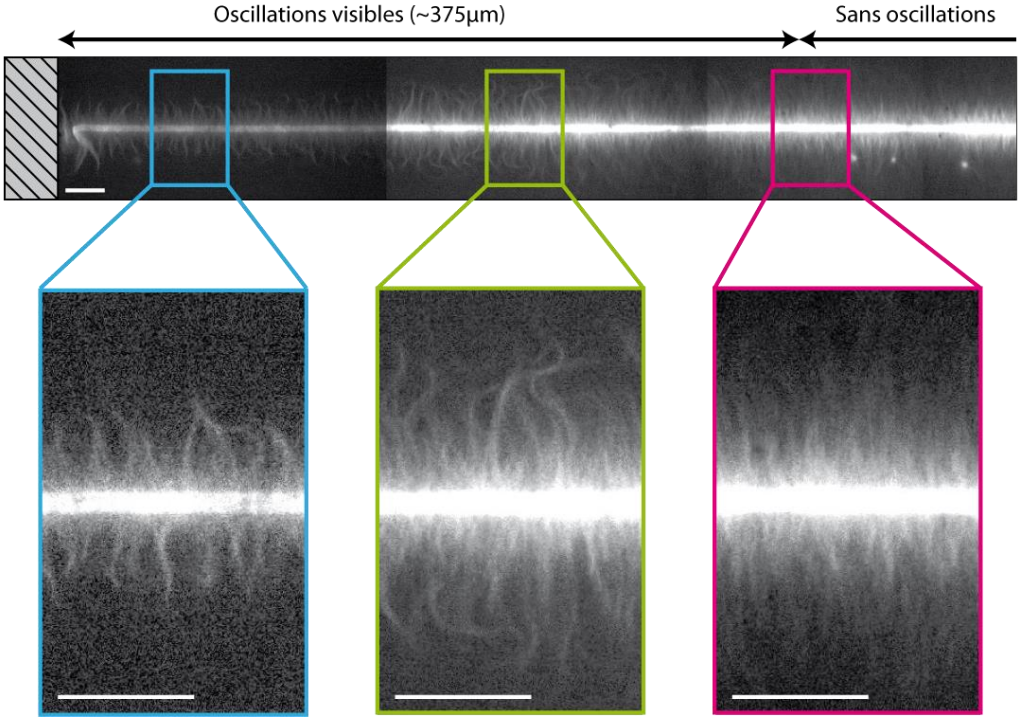


Figure 105 : Géométrie du réseau d'actine selon la position par rapport aux bords de la chambre expérimentale. Le réseau de filaments d'actine est polymérisé à partir d'une ligne de nucléation épaisse de 3 µm et perpendiculaire aux bords. La concentration d'HMM-II en solution est de 240 nM. Echelle 20 µm (Barre blanche).

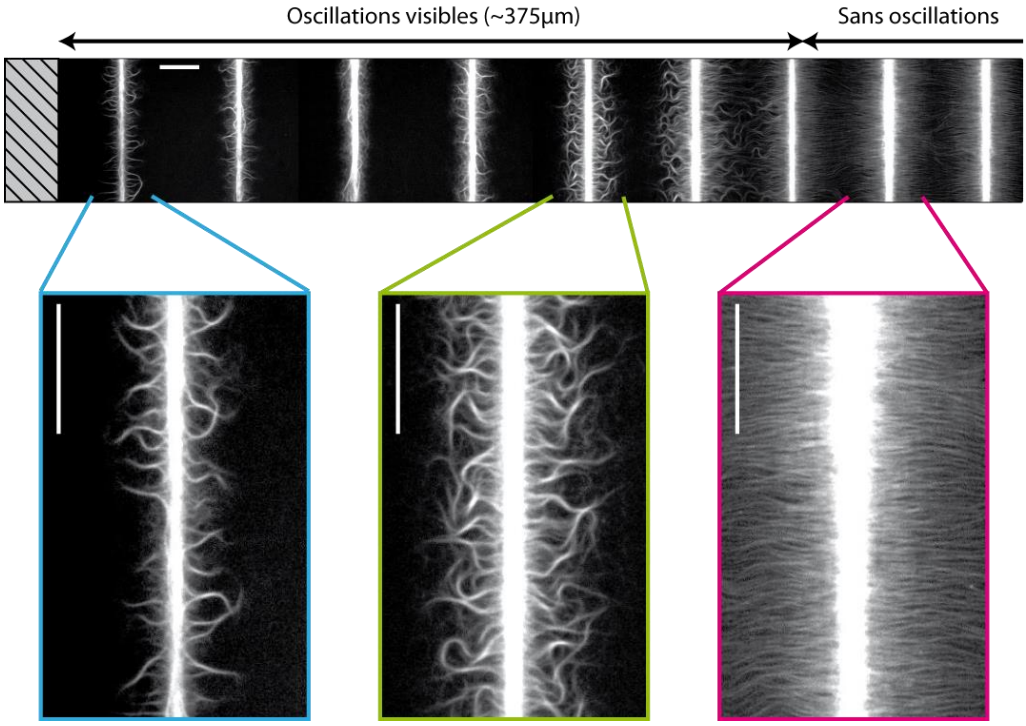


Figure 106 : Géométrie du réseau d'actine selon la position par rapport aux bords de la chambre expérimentale. Le réseau de filaments d'actine est polymérisé à partir d'un ensemble de lignes parallèles aux bords, larges de 3 µm et espacées d'environ 50 µm. La concentration d'HMM-II en solution est de 240 nM. Echelle 20 µm (Barre blanche).

Des oscillations sont observées pour des concentrations de myosines allant de 100 à 600nM (avec la HMM-II). Des oscillations sont également observées avec la HMM-V (à une concentration de 260nM). Ce résultat permet de conclure que la propriété processive ou non-processive du moteur n'est pas cruciale pour produire des oscillations.

b. Réorganisation des réseaux sous l'effet de la lumière et de l'activité de myosines

Nous avons observé une forte influence de l'illumination sur la structure des faisceaux d'actine en présence de myosines (Figure 107). Dans les zones d'inactivité (aucun battement visible), l'illumination réduit l'intensité de la fluorescence du réseau d'actine mais la structure semble inchangée. En revanche, dans les zones d'activité d'oscillations, l'illumination change radicalement la structure des faisceaux d'actine. Sous l'effet de la lumière, les faisceaux d'actine ont tendance à fusionner, ce qui conduit à une augmentation de la largeur des faisceaux. Une conséquence de ce changement est le ralentissement des oscillations jusqu'à leur extinction. Ce résultat suggère que l'illumination libère localement, à travers le fluorophore (voir page 54), des contraintes dans le réseau de filaments d'actine, ce qui permet aux myosines de réorganiser le réseau.

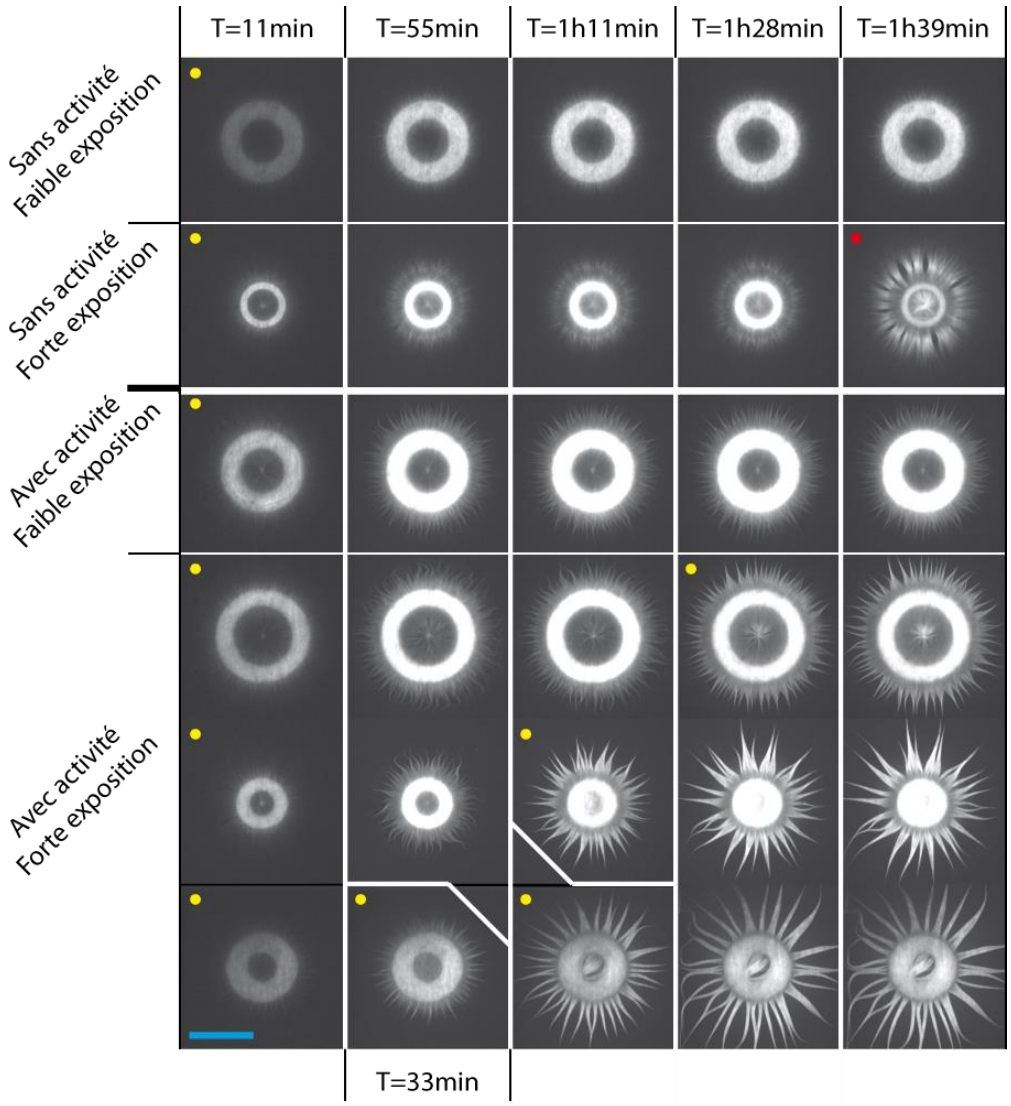


Figure 107 : Illustration de l'influence de l'illumination sur la structure d'un réseau d'actine. Les points jaunes indiquent une illumination de 4 min avant la prise du cliché. Le point rouge indique une illumination de 4 min avant la prise du cliché avec une puissance lumineuse double au cas décrit par les points jaunes. Dans tous les cas, la concentration d'HMM-II en solution est de 240 nM. Echelle 50 µm (Barre bleue).

2. Le comportement individuel d'un 'flagelle' d'actine

Nous présentons ici une caractérisation d'un mouvement oscillant d'un 'flagelle' d'actine (Figure 108). Le faisceau d'actine s'amincit progressivement de sa base (0,7 µm) à sa pointe. Durant les cycles de battement, à sa pointe, les filaments composant le 'flagelle' peuvent parfois se dissocier, générant une nappe de filaments (Figure 109). Ce phénomène dure au maximum une vingtaine de secondes. La pointe redevient ensuite cohésive.

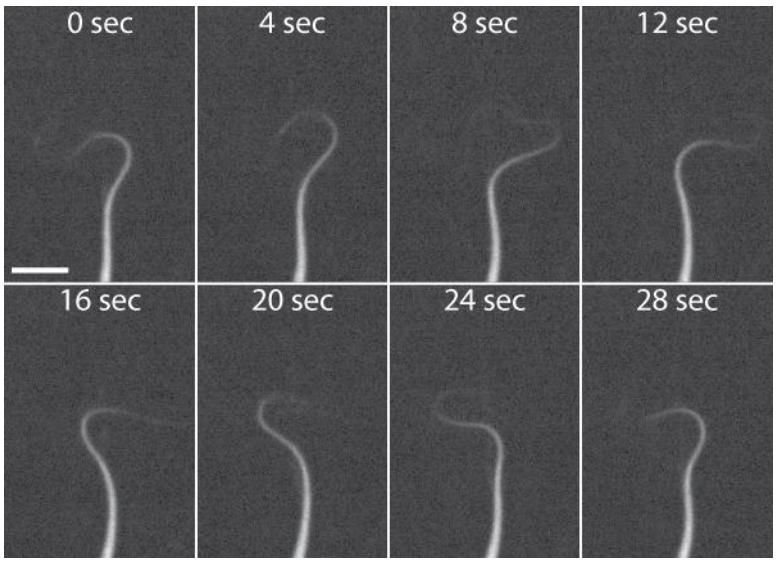


Figure 108 : Illustration d'un cycle de battement d'un faisceau de filaments d'actine activé par 240 nM d'HMM-II en solution. Echelle 2 µm (Barre blanche).

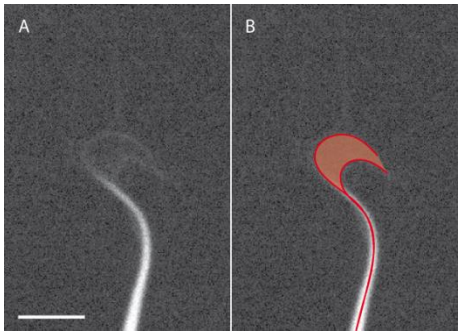


Figure 109 : Illustration du phénomène de dissociation de la pointe d'un faisceau de filaments d'actine activé par 240 nM d'HMM-II en solution. Echelle 2 µm (Barre blanche). A : Image de fluorescence du flagelle d'actine. B : Image de fluorescence du flagelle d'actine sur laquelle la nappe de filaments d'actine a été colorée en rouge.

Pour étudier la forme du faisceau d'actine au cours du temps, nous avons utilisé le programme 'Ridge detection' développé sous Fiji (Figure 110.A). L'analyse est ensuite effectuée avec un programme que nous avons développé sous Matlab®. Pour chaque image, une abscisse curviligne est définie. La base du flagelle, qui est immobile au cours du temps, est choisie comme origine. L'abscisse maximale se trouve alors à la pointe du flagelle (Figure 110.B). Le battement du faisceau est étudié à travers son angle d'inclinaison à chaque abscisse. L'inclinaison est considérée comme nulle à l'origine (Figure 110.A).

Jusqu'à une abscisse curviligne de 3 µm, le battement est quasi-inexistant (Figure 110.C). Au-delà, plus l'abscisse curviligne est importante, plus l'oscillation a une amplitude élevée. A certains instants, la pointe se retourne même à -180°. Le 'flagelle' présente ici 13 battements avant de s'arrêter (Figure 110.D). L'arrêt intervient seulement 10 minutes après le début de l'acquisition, soit 1 heure et 05 minutes après le démarrage de la polymérisation, alors que des oscillations ont été observées jusqu'à 2 heures après le démarrage de la polymérisation du réseau. Il est probable que l'illumination soit responsable de l'arrêt de l'oscillation.

La vitesse de propagation de l'onde le long du flagelle semble indépendante de la position curviligne et du temps. Elle vaut ainsi approximativement 0,5 µm/s (Figure 110.G). Au cours du temps la période de l'onde croît, passant de 25 secondes à 40 secondes (Figure 110.E). Comme la largeur du faisceau augmente au cours du temps (Figure 110.F), il semblerait que plus le flagelle est large, plus le battement est lent. Cette analyse vient renforcer les observations évoquées ci-dessus.

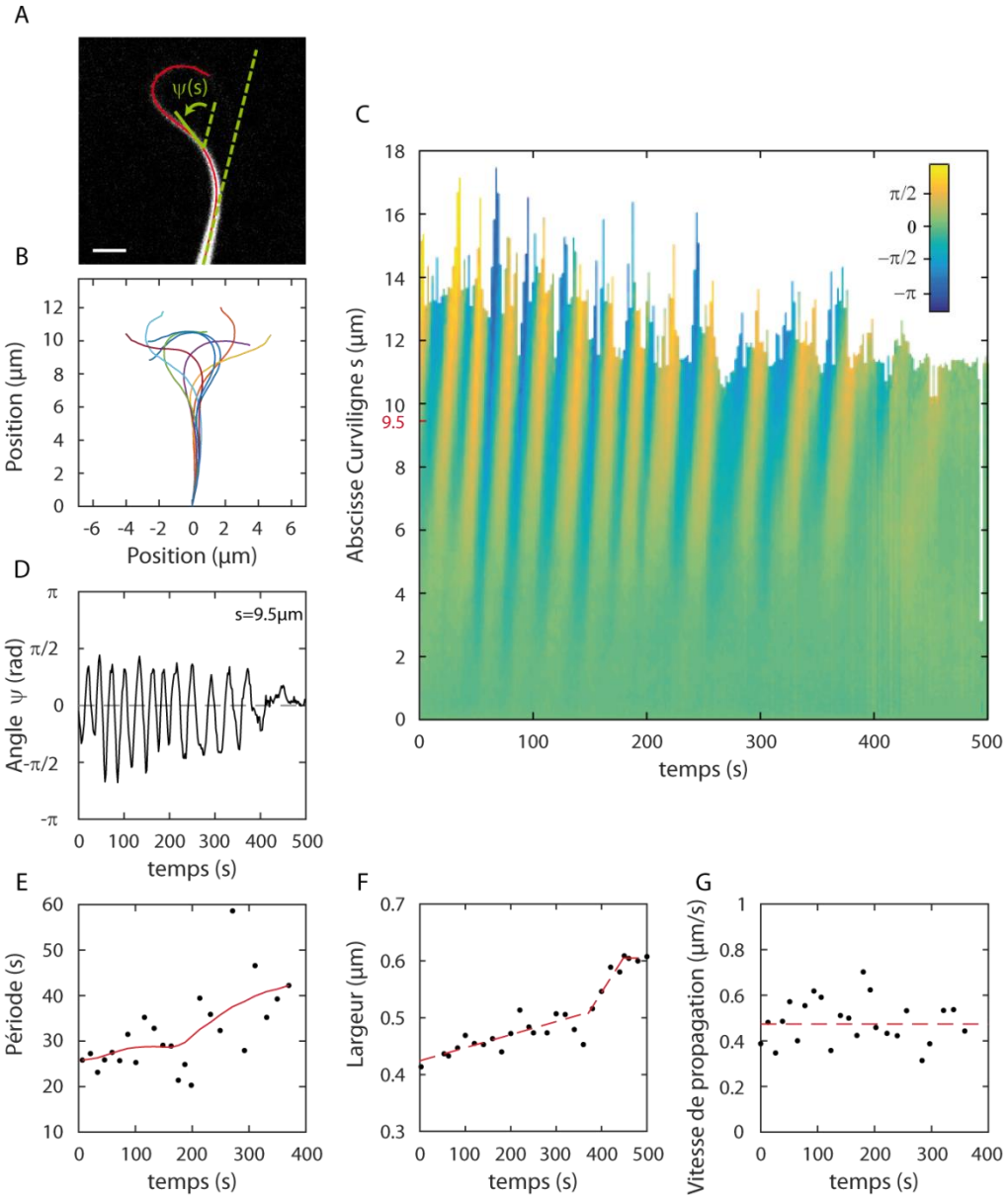


Figure 110 : Analyse des battements d'un faisceau de filaments d'actine en présence de 240 nM d'HMM-II. A : Image en fluorescence du faisceau. En rouge : détection du faisceau. En vert : définition de l'angle d'inclinaison du flagelle ψ pour une abscisse curviligne donnée. Echelle 2 µm (Barre blanche). B : Position du flagelle aux instants 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 et 28 secondes. C : carte graphique colorée décrivant la variation de l'angle ψ (rad) en fonction de l'abscisse curviligne s (µm) et du temps (s). D : variation temporelle de l'angle ψ en fonction du temps pour l'abscisse curviligne s= 9,5 µm. E : variation de la période de l'onde en fonction du temps, moyennée entre les positions curvilignes 9 et 10 µm. F : Estimation de la largeur du flagelle à une abscisse curviligne de 9,5 µm. G : vitesse de propagation de l'onde le long du flagelle en fonction du temps, estimée à partir des positions curvilignes situées entre 6 et 10 µm. Pour obtenir ces données, une image a été enregistrée toutes les 100 ms avec un temps d'exposition de 100 ms.

3. Le comportement collectif de 'flagelles' d'actine

a. Faisceaux parallèles

Nous avons observé que les flagelles sont capables de battre en phase (Figure 111, cadre rouge). Cette synchronisation peut concerner jusqu'à trois flagelles, soit une distance de 15 µm. De même, des flagelles peuvent également être en opposition de phases (Figure 111, cadre bleu). Cependant, ces propriétés ne sont pas constantes dans le temps. La synchronisation peut être perdue, déphasant ainsi les battements entre les flagelles (Figure 111, cadre vert).

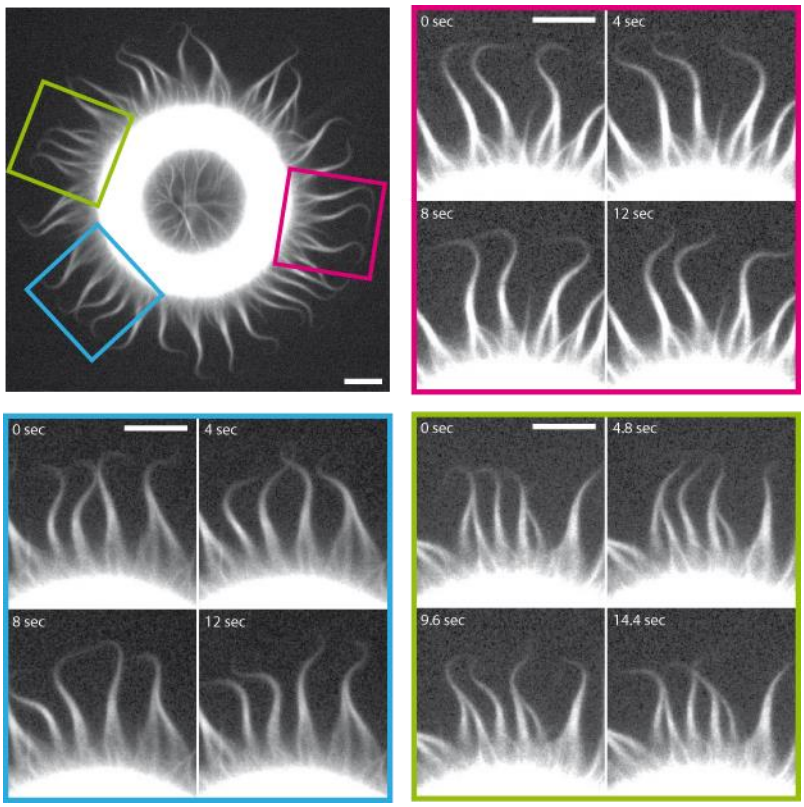


Figure 111 : Illustration de la synchronisation de flagelles parallèles en présence de 240 nM d'HMM-II. Le réseau d'actine est polymérisé à partir d'un anneau de pWA, large de 10 µm et d'un diamètre moyen de 40 µm. En magenta : exemple de flagelles en phase. En bleu : exemple de flagelles en opposition de phase. En vert : exemple de perte de phase entre flagelles. Echelle 10 µm (Barre blanche).

b. Fusion de faisceaux

Lorsque deux faisceaux oscillants de même polarité se rencontrent, ils sont capables de fusionner pour ne former qu'un seul flagelle, plus épais. Le battement est ainsi ralenti, comme il a été démontré précédemment (Figure 107 et Figure 110.E).

De même, lorsque deux flagelles aux polarités opposées se rencontrent, une fusion s'opère également. Le battement est alors progressivement détruit, mais aucune contraction n'apparaît (Figure 112).

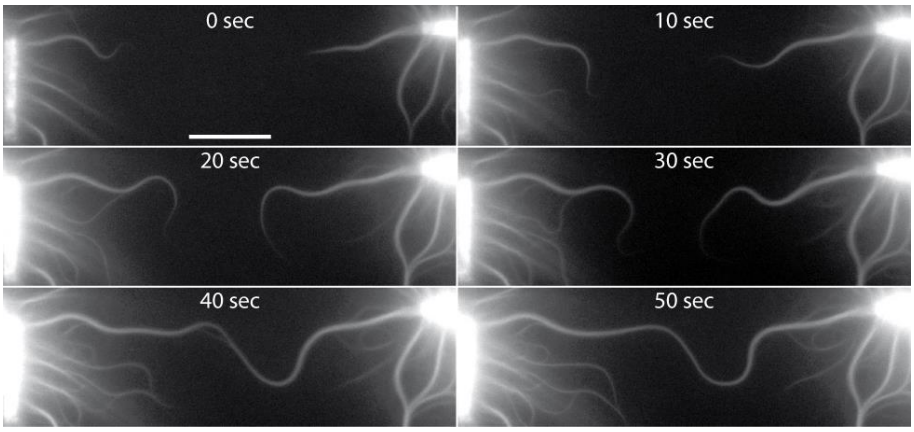


Figure 112 : Illustration de l'interaction entre des flagelles antiparallèles en présence de 100nM d'HMM-II. Echelle 20 µm (Barre blanche). (Expérience réalisée avec l'aide de H.Ennomani.)

Conclusions et Perspectives

Les travaux développés dans cette thèse permettent d'éclairer l'influence de la structure d'un réseau de filaments d'actine sur l'activité d'une assemblée de myosines (Chapitre III) et, à l'inverse, comment l'activité des myosines peut modifier la structure d'un réseau de filaments (Chapitre IV). Nous nous sommes intéressés à deux fonctionnalités de la myosine : le transport d'un cargo d'un endroit à l'autre du réseau et la production d'oscillations mécaniques par déformation du réseau de filaments. *In vivo,* les réseaux de filaments d'actine sont complexes et variés, ce qui rend difficile l'étude des propriétés générales d'une assemblée de moteurs en interaction avec l'actine.

L'approche entreprise ici permet de simplifier l'environnement des myosines en produisant *in vitro*, à partir d'un nombre minimal de protéines, un système actomyosine dont la géométrie est contrôlée. L'utilisation de patrons surfaciques de nucléation de l'actine et d'un agent de déplétion (la méthylcellulose) permet de générer des réseaux de filaments en feuillet (épaisseur de ~200nm). A partir de lignes parallèles de nucléation, nous avons pu fabriquer des réseaux monodimensionnels antiparallèles. Les profils de densité des filaments qui émergent de chacune des lignes de nucléation sont exponentiels, de sorte que la structure globale présente une symétrie miroir par rapport à la ligne médiane. A mi-distance entre les deux lignes, la densité des filaments orientés dans un sens est égale à la densité des filaments orientés dans l'autre sens. La simplicité de ces structures facilite grandement l'analyse quantitative des comportements observés en présence de myosines.

Nous avons tout d'abord décrit les propriétés du transport de billes (200 nm de diamètre) fonctionnalisées par des myosines. Les billes de myosines II, V et VI ont démontré leur capacité à sonder la polarité locale du réseau pour moyenner la polarité des filaments d'actine qui entourent les billes et ainsi mesurer une densité de polarité. En fonction de cette densité (=polarité moyenne), le cargo présente des vitesses de déplacement plus ou moins importantes. Le lieu de polarité moyenne nulle est une zone d'équilibre où la vitesse des cargos s'annule. Cet équilibre peut être stable ou instable en fonction du sens de déplacement des moteurs. Ainsi, pour les billes de myosines VI, qui se déplacent vers le bout pointu des filaments d'actine, et donc vers les lignes de nucléation, l'équilibre est instable : les billes s'accumulent aux bords du réseau sur les lignes de nucléation. Au contraire, les billes de myosines II et V se positionnent là où la polarité moyenne est nulle ; le centre du réseau est une position d'équilibre stable.

Dans le cas des myosines II et V, nous avons montré que les billes trouvent le centre du réseau avec la même précision quelle que soit la taille du système. Ce résultat en apparence surprenant est expliqué par notre modèle de transport à 3 états. En effet, le modèle prédit que la variance du positionnement doit être inversement proportionnelle au gradient du paramètre de polarité $\phi(x)= \delta\rho(x)/ \rho(x)$ au point où il s'annule ($x= 0$). Nous rappelons que $\delta\rho=\rho_+- \rho_-$ représente la différence de densité entre les filaments de chaque polarité à une position donnée et $\rho=\rho_++ \rho_-$ est la densité totale en actine. Comme les profils $\rho_\pm$ sont exponentiels, le gradient de polarité est

donné par l'inverse de la longueur moyenne des filaments d'actine $\lambda \cong 8$ µm. Il est donc indépendant de la taille du système.

La précision du centrage ne dépend pas que de la structure du réseau d'actine mais aussi des propriétés du moteur : les billes de myosines II se positionnent moins précisément, avec un écart type 30% plus élevé (60% pour la variance), que les billes de myosines V. Les billes de myosine II se déplacent plus vite dans le réseau que les billes de myosines V, ce qui conduit à un gradient de vitesse plus élevé ($\times$1,25 en valeur absolue ; Tab. 11) lorsque les billes se rapprochent de la position de polarité nulle ($\phi = 0$), où elles s'arrêtent. Même si cette propriété favorise un positionnement des billes plus précis avec la myosine II, le contraire est pourtant observé. En effet, la précision du positionnement ne dépend pas que du gradient des vitesses mais également de la stochasticité du transport des billes. Le coefficient de diffusion effectif des billes de myosines II est plus de deux fois plus important que celui des billes de myosines V ($\times$2,17 ; Tab. 11). Comme la variance du positionnement est donnée par le rapport du coefficient de diffusion sur le gradient des vitesses, c'est ici la diffusion qui l'emporte. C'est pourquoi le centrage observé avec les billes de myosines II est moins précis qu'avec les billes de myosines V. Notre modèle à 3 états du transport des billes indique que les billes suivent une marche aléatoire biaisée. Le paramètre moteur fondamental qui contrôle la précision du centrage est la longueur balistique ℓ_B, c'est-à-dire la distance moyenne parcourue par une bille quand elle est accrochée à l'actine avant qu'elle ne se décroche. Cette longueur caractéristique correspond au pas élémentaire de la marche aléatoire. Plus elle est grande, plus la trajectoire est bruitée et moins le centrage est précis. C'est donc le type de bille active qui se déplace le moins entre deux évènements de décrochage qui aura la distribution de position à l'état stationnaire la plus étroite. Comme la myosine V est un moteur processif, nous nous attendons à ce qu'une bille de myosines V passe en moyenne plus de temps accroché à l'actine qu'une bille de myosines II, un moteur non-processif qui se décroche souvent de l'actine. C'est effectivement ce qui est observé. Cependant, la vitesse de la myosine V est beaucoup plus faible que celle de la myosine II. Il en résulte une longueur balistique plus faible pour la myosine V. C'est la raison pour laquelle le centrage est plus précis avec la myosine V qu'avec la myosine II. Il est à noter que le centrage n'est observé que si la longueur balistique est significativement plus faible que la longueur qui caractérise les gradients de densité du réseau de filaments (ici la longueur moyenne des filaments λ). Dans le cas contraire, nous nous attendons à ce que les billes 'traversent' l'hétérogénéité de densité sans s'arrêter. Cela donne une règle pour que les moteurs puissent sonder l'architecture locale d'un réseau hétérogène, et donc pour que le transport du cargo soit affecté par l'hétérogénéité de la structure. Dans le cas où les billes ont la capacité à sonder activement la polarité moyenne du réseau ($\ell_B < \lambda$), le modèle prédit que la précision du positionnement des billes est optimale lorsque la longueur balistique est comparable à la distance moyenne parcourue par le cargo dans l'état décroché ($\ell_B \cong \ell_D$).

D'autre part, nos expériences ont mis en évidence que, selon le moteur, la stratégie de positionnement diffère. Avec la myosine II, moteur non processif, les cargos se déplacent avec un mouvement dirigé très bruité vers le centre du réseau, avant de s'y arrêter (en moyenne) et d'y explorer l'environnement par diffusion. Ce type de trans-

port pourrait être utile pour rechercher une cible rare ou pour distribuer les molécules contenues dans le cargo dans une région relativement étendue autour de la position d'équilibre. En revanche, avec la myosine V, moteur processif, le transport des cargos est très dirigé vers le centre du réseau où ils s'immobilisent ; il y a très peu d'exploration diffusive autour de la position d'équilibre. Ce résultat est conforme avec le comportement d'un moteur dédié au transport intracellulaire, si la cible du transport se trouve bien là où le cargo s'arrête. Cependant, dans le cas d'une cible rare, il faut compter sur une exploration spatiale d'un ensemble de cargos pour avoir une chance que l'un d'entre eux n'atteigne ladite cible.

Même s'il reste bien sûr beaucoup à faire, ce travail apporte un éclairage sur les règles générales qui pourraient régir le transport de cargos par de petits groupes de moteurs moléculaires dans la cellule. En particulier, il a permis d'identifier différents paramètres physiques entrant en jeu dans ce processus. Il existe une série de développements possibles à notre étude. Il serait intéressant d'étudier comment le positionnement des billes dépend du nombre de moteurs, par exemple en utilisant des origamis d'ADN (Hariadi et al. 2014). Nous pourrions également faire varier l'espacement entre les filaments à l'aide d'agents réticulants comme la fimbrine ou l'α-actinine. Dans notre étude, les filaments sont parallèles, ou antiparallèles. Etudier le transport de cargos dans des réseaux de filaments enchevêtrés, comme il est possible d'en observer dans le lamellipode, ou à l'intersection de deux réseaux parallèles avec un angle contrôlé, peut être une autre voie à explorer.

Dans le Chapitre IV, nous avons présenté une étude préliminaire de l'effet de la myosine sur la structure d'un réseau de filaments d'actine lorsque les moteurs moléculaires sont présents dans le volume de la solution. Contrairement à ce qui avait été observé précédemment avec la myosine VI et avec myosine II entière, la myosine II HMM et la myosine V HMM ne produisent pas de contractions suivies d'un désassemblage du réseau d'actine dans les zones branchées ou antiparallèles. Cependant, dans les réseaux parallèles, nous avons observé la formation de faisceaux de filaments qui battent comme le flagelle des spermatozoïdes ou de l'algue Chlamydomonas. Un phénomène similaire d'auto-organisation dynamique avait été observé *in vitro* avec des microtubules ancrés à l'interface eau-air de bulles d'air en solution (Sanchez et al. 2011). Dans nos expériences, la période d'oscillations peut atteindre la dizaine de secondes. Les battements observés sont ainsi plus rapides que ceux des microtubules (période de 5 min, Sanchez et al. 2011), mais bien plus lents que ceux du spermatozoïde (50 ms, Riedel-Kruse et al. 2007) ou ceux du Chlamydomonas (16 ms, Brokaw et al. 1982). Notre système acto-myosine oscillant semble pertinent pour appréhender les mécanismes généraux expliquant l'apparition de battements dans des faisceaux de filaments, qu'ils soient faits de microtubules ou de filaments d'actine. Il est en particulier très intéressant de voir que des oscillations peuvent apparaître avec des filaments dont les propriétés mécaniques sont très différentes (longueur de persistance très différente). Outre l'oscillation d'un 'flagelle' individuel d'actine, nous avons observé que des flagelles voisins ont la capacité de se synchroniser entre eux, que cela soit en phase ou en opposition de phase. Il y a donc là probablement un système innovant pour étudier la physique générale des phénomènes de synchronisation et ainsi

éclairer le comportement de systèmes beaucoup plus complexes comme la synchronisation observée entre les deux flagelles de Chlamydomonas (Wan et al. 2014).

Actuellement, ce projet n'en est qu'à ses balbutiements. Dans un premier temps, il s'avère nécessaire de maîtriser complètement le processus de formation des flagelles, qui n'apparaissent qu'en bordure de la chambre expérimentale pour une raison inconnue. Une première piste serait d'étudier l'influence de la viscosité sur ce processus, notamment en variant la concentration de la méthylcellulose. En second lieu, les expériences démontrent que plus le faisceau de filaments d'actine est large plus la période d'oscillation du flagelle est lente. A la vue de cette observation préliminaire, il serait utile d'étudier la relation entre la largeur du flagelle et sa période de battement, notamment à travers une description théorique du système. Enfin, au-delà des propriétés géométriques du flagelle, il faudra élucider l'influence des myosines dans ce processus d'oscillation. La mécano-sensibilité des moteurs étant l'ingrédient de base des modèles développés pour décrire les systèmes oscillants, une première question peut déjà être posée : comment des groupes de moteurs faiblement mécano-sensibles (voir page 40) comme les myosines II et V peuvent-ils générer des oscillations ?

Annexes

A Données supplémentaires

1. Trajectoires de billes passivées avec du PEG dans un réseau antiparallèle, parallèle de filaments d'actine ou en l'absence d'actine.

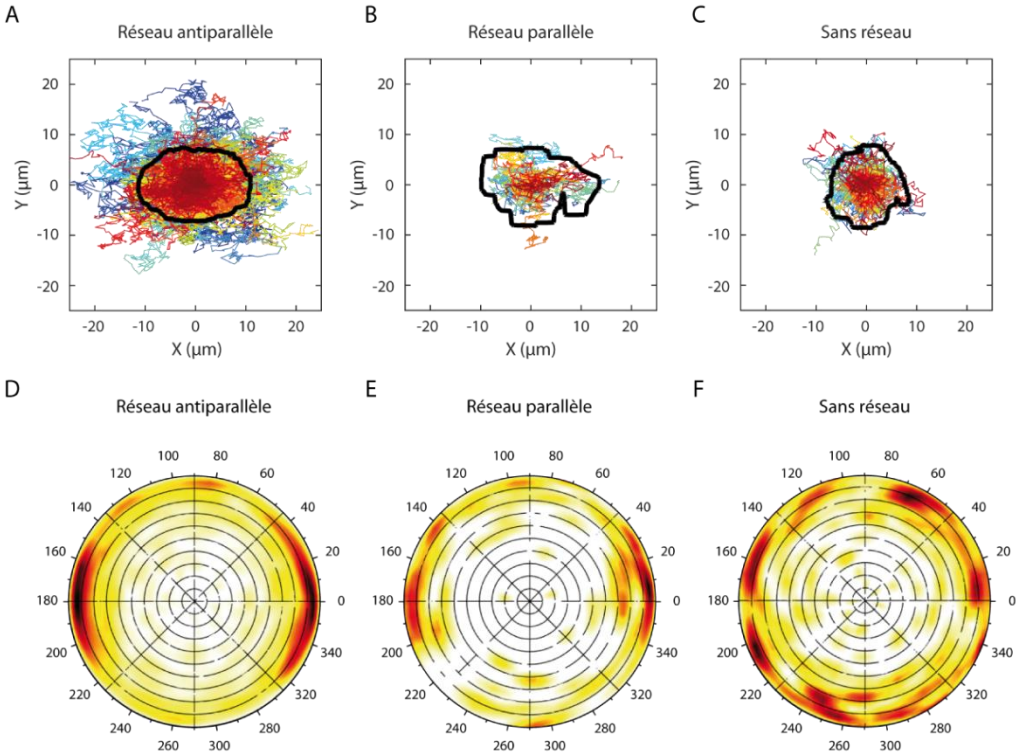


Figure 113 : Exploration des billes mobiles PEG. Panels A-B-C : Trajectoires des billes. L'axe des filaments est noté X et l'axe perpendiculaire Y. Sur les graphes, la position initiale des billes est ramenée à l'origine du repère. Les trajectoires sont différenciées par un gradient de couleur. La zone délimitée par le tracé noir englobe 97% des trajectoires. Panels D-E-F : Les graphes représentent les histogrammes polaires des directions des trajectoires (angle compris entre 0 et 180) et de l'indice de confiance associé (R^2 compris entre 0 et1). L'angle est nul lorsque les trajectoires sont alignées avec les filaments d'actines et que le sens du mouvement est vers les x positifs (voir Figure 55). L'indice de confiance varie par pas de 0,1 (cercles concentriques) ; le cercle extérieur représente ainsi un indice de confiance de 1. La densité de population des histogrammes est représentée par une échelle colorimétrique. L'intensité augmente du blanc au noir, en passant par des nuances allant du jaune au rouge. Panels A-D : réseau antiparallèle, n= 1078. Panels B-E : réseau parallèle, n= 47. Panels C-F : sans réseau, n= 475.

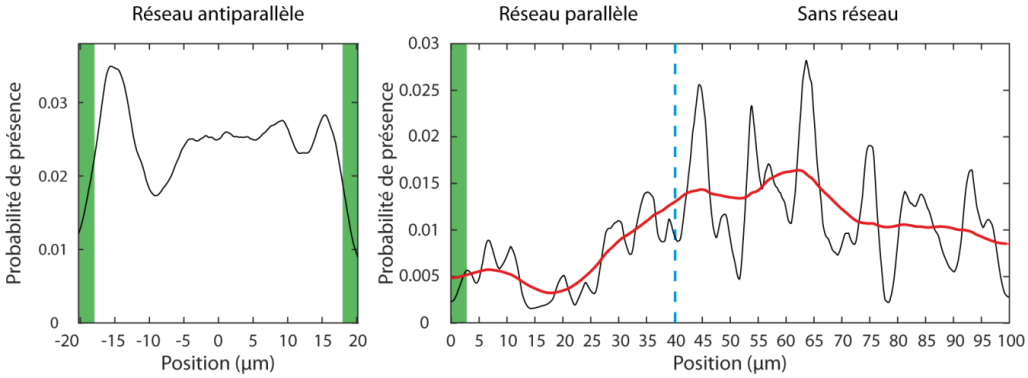


Figure 114 : Probabilité de présence des billes PEG (mobiles et immobiles) selon le type de réseau et la position suivant l'axe des filaments. En vert : lignes de nucléation. Réseau antiparallèle : n= 1078. Réseau parallèle et sans réseau : n= 245. La densité de probabilité est lissée sur une fenêtre de 8 µm (rouge).

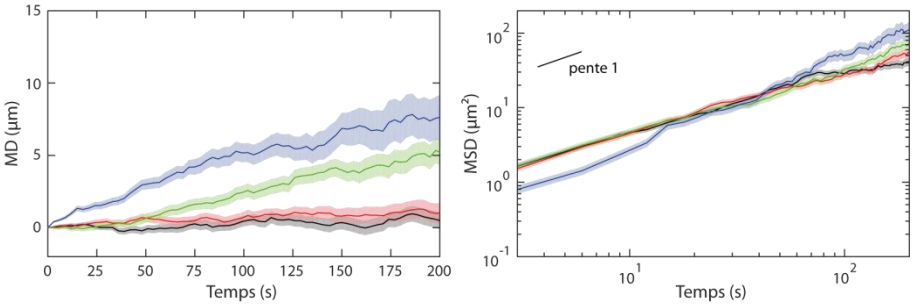


Figure 115 : Déplacement moyen (MD) et déplacement quadratique moyen (MSD) de billes PEG dans un réseau antiparallèle à partir de différentes positions entre les deux lignes de nucléation. Les lignes de nucléation sont espacées de 40 µm et ont une largeur de 3 µm. Le point à mi-distance des deux lignes définit le centre du réseau. Le déplacement moyen (MD) et le déplacement quadratique moyen (MSD) sont estimés en fonction du temps pour les billes situées à l'origine des temps à des distances de 0 µm (noir), 5 µm (rouge), 10 µm (vert), et 15 µm (bleu) du centre du réseau.

2. Comparaison des vitesses maximales observées dans des trajectoires individuelles entre le réseau parallèle et antiparallèle

Les billes-myosines présentent des vitesses maximales semblables dans le réseau parallèle et antiparallèle (Figure 116). Les billes-myosines II vont plus vite que les billes-myosines V.

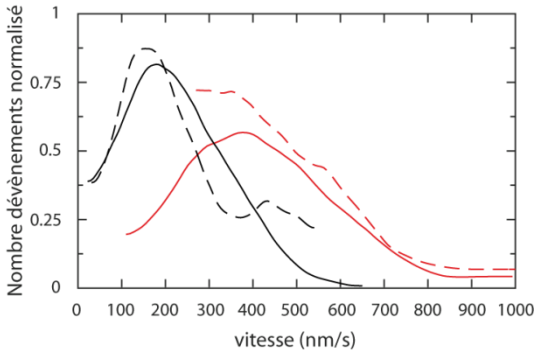


Figure 116 : Distribution des vitesses maximales le long de trajectoires x(t) suivant l'axe des filaments d'actine (axe X) dans le réseau antiparallèle (Courbes continues). Seules les billes parcourant une distance supérieure à 10 µm ont été prises en compte. En pointillé : vitesse dans le cas d'un réseau parallèle. En noir : billes - myosine V (n= 85). En rouge : billes-myosines II (n= 102).

3. Influence de la fenêtre d'observation sur l'estimation de la vitesse et du coefficient de diffusion locaux des billes ainsi que sur la distribution stationnaire qui en résulte

Etant donné une position x_0 dans le réseau, nous détectons les billes dont les positions sont comprises entre x_0 et $x_0+\Delta x$, avec $\Delta x=0{,}1$ µm, sur chaque image du film. Nous mesurons ensuite le déplacement moyen et le déplacement quadratique moyen de ces billes, en regardant où elles se trouvent une durée τ après l'instant où elles ont été détectées dans la fenêtre d'observation. Nous déduisons de l'ensemble des déplacements des billes une vitesse V_{EFF} et un coefficient de diffusion D_{EFF} moyen à la position x_0. A partir des profils $V_{EFF}(x_0)$ et $D_{EFF}(x_0)$, nous calculons une distribution de positions des billes à l'état stationnaire (page 76 et suivantes). Nous montrons ici que les profils et la distribution dépendent faiblement du choix de la fenêtre d'observation autour de $\tau=$ 12 s.

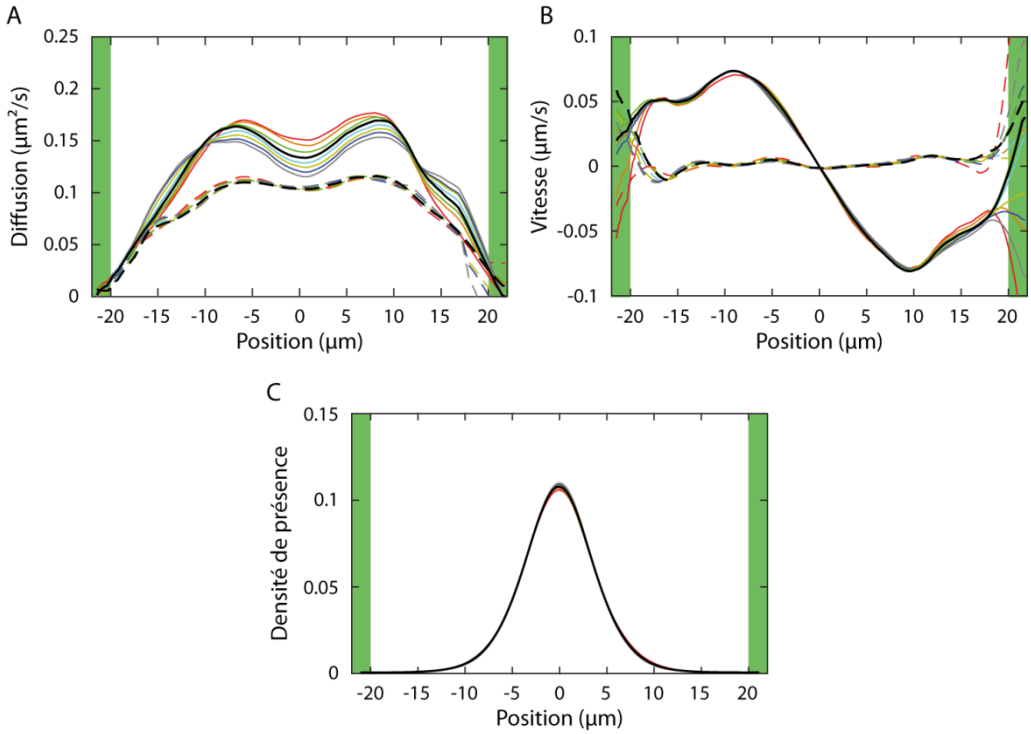


Figure 117 : Diffusion (A), vitesse (B) et distribution des billes-myosines II (C) dans un réseau antiparallèle en fonction de la durée τ de la fenêtre d'observation (voir page 74). Rouge : τ= 3 s. Marron : τ= 6 s. Vert : τ= 9 s. Noir : τ= 12 s. Cyan : τ= 15 s. Kaki : τ= 18 s. Bleu : τ= 21 s. Gris : τ= 24 s.

4. Ajustement de la distribution stationnaire des billes par une gaussienne

Lors de nos expériences, les distributions de positions des billes de myosines dans le réseau antiparallèle sont bien décrites par des gaussiennes. La Figure 118 illustre cette observation.

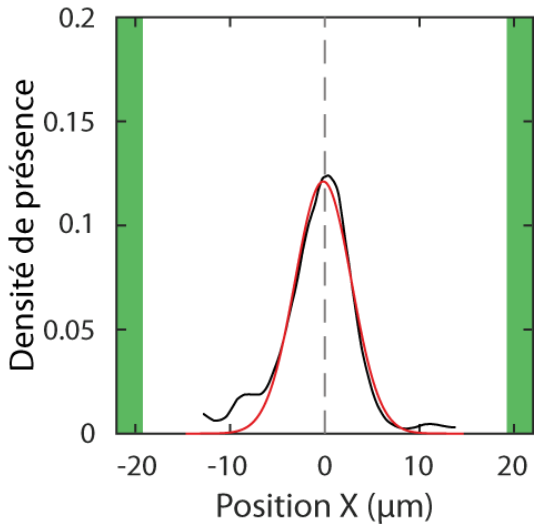


Figure 118 : Densité de probabilité de position X des billes (ligne noire) **des billes-myosines II dans un réseau antiparallèle et son ajustement par une gaussienne** (ligne rouge, coefficient de détermination R^2= 0,97). La distribution en noir est obtenue en ne prenant en compte que les trajectoires qui durent plus de 200s et en relevant la position de ces billes de t= 200 s à la fin de leurs trajectoires ; il s'agit d'une estimation de la distribution de position des billes à l'état stationnaire.

5. Test de la description du transport de billes actives par un processus de convection-diffusion.

Nous comparons ici, par le biais de leurs écart types, la distribution de position des billes mesurée après 30 min à celle calculée à partir des profils de vitesse et de diffusion (Figure 82) en supposant que le transport suit un processus de convection-diffusion. Les écarts types sont plus grands (+0,3 µm) pour les distributions mesurées directement, ce qui suggère que le système n'a pas atteint l'état stationnaire après 30 minutes d'expérience (Figure 119). Cela peut être dû à l'apparition de nouvelles billes dans le réseau.

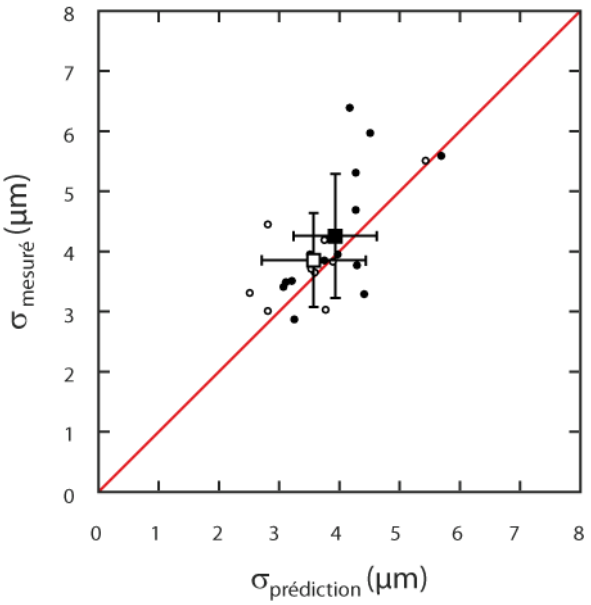


Figure 119 : Comparaison des écarts types σ des distributions de position des billes. Abscisse : Ecart type estimé en supposant que le transport suit un processus de convection-diffusion (la distribution stationnaire est estimée à partir des profils de vitesse et de diffusion des billes). Ordonnée : Ecart type de la distribution des billes mesuré en relevant la position des billes au bout de 200 s après le début de leurs trajectoires. Cercle plein : cas de billes-myosines II (n= 16). Cercle vide : cas de billes-myosines V (n= 10). Ligne rouge : droite de pente 1 passant par l'origine. En moyenne, l'écart type mesuré directement est 0,3 µm plus élevé que celui estimé à partir des profils de vitesse et de diffusion.

B Programmes et Calculs

1. ImageJ (Détection de particule)

   a. Paramètres de détection des filaments

Paramètre TrackMate	Valeur
Detector	LoG detector
Estimated blob diameter	5 (pixel)
Threshold	1,2
Use median filter	uncheck
Do sub-pixel localization	check
Blob quality filter	none
Spot filter	none
Tracker	Linear Lap Motion Tracker
Initial search radius	15 (pixel)
Search radius	10 (pixel)
Gap-closing max frame gap	2
Tracks filter	Number of spots in tracks > 10

   b. Paramètres de détection des billes

Paramètre TrackMate	Valeur
Detector	LoG detector
Estimated blob diameter	5 (pixel)
Threshold	0,5
Use median filter	uncheck
Do sub-pixel localization	check
Blob quality filter	none
Spot filter	none
Tracker	Simple LAP tracker
Linking max distance	15 (pixel)
Gap-closing max distance	15 (pixel)
Gap-closing max frame gap	2
Tracks filter	none

   c. D'ImageJ à Matlab®

Les données obtenues sous ImageJ sont alors enregistrées sous format '.xml'. Pour des vidéos de 400 images un fichier xml ne doit pas contenir plus de 700 trajectoires. Dans le cas contraire Matlab® n'arrivera pas à les ouvrir. Pour enregistrer en plusieurs fichiers il suffit d'utiliser des filtres spatiaux ('Tracks filter'). Pour un chargement automatique de tous les fichiers dans le programme Matlab® le énième fichier devra avoir le même nom que le premier avec le suffixe '_n'. Les fichiers xml sont

lourds à charger par Matlab® : après chargement des données, elles sont donc directement enregistrées dans un fichier mat, format mieux adapté.

2. Régression linéaire sur une trajectoire d'une bille

Afin de quantifier le caractère directionnel de la trajectoire d'une bille, nous appliquons une régression linéaire sur les données (x(t), y(t)), où x et y représentent respectivement l'abscisse et l'ordonnée de la bille dans le plan d'observation. Pour cela, il nous faut déterminer la droite qui minimise la distance quadratique moyenne entre les points expérimentaux et la droite (Figure 120, droite). Il est à noter que l'algorithme de régression linéaire classique, implémenté par exemple sous Matlab®, minimise l'écart quadratique moyen entre les ordonnées (y) des points expérimentaux et des points de la droite de régression (Figure 120, gauche). L'axe X n'a donc pas d'influence sur cette minimisation. Cette méthode est adaptée aux cas où les abscisses sont connues avec précision mais pas aux cas de trajectoires où l'abscisse et l'ordonnée des points expérimentaux fluctuent. D'ailleurs le cas particulier x=constante ne peut pas être déterminé par cette méthode. Nous avons donc développé notre propre algorithme, en faisant attention à ce que la qualité de la régression soit indépendante de l'orientation de la trajectoire. Les paramètres à estimer sont l'angle θ entre la droite et l'axe X et une origine c (Figure 120) :

$$-\sin(\theta).x + \cos(\theta).y + c = 0$$

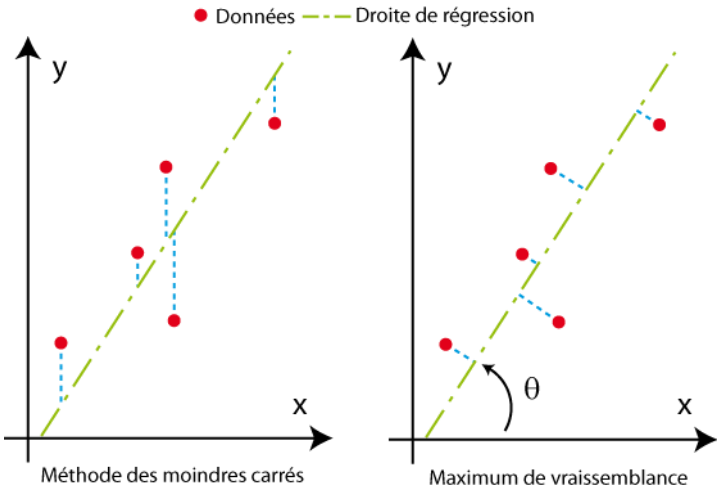


Figure 120 : Différentes régressions linéaires. La régression linéaire a pour but de minimiser la somme des distances visibles en bleue. A gauche : méthode classique. A droite : la méthode développée dans cette thèse.

Soit une donnée $P_i(x_i,y_i)$, la distance D_i entre ce point et la droite s'écrit alors :

$$D_i = -\sin(\theta).x_i + \cos(\theta).y_i + c$$

Ainsi la méthode des moindres carrés revient à minimiser la fonction suivante :

$$f(c,\theta) = \sum_{i=1}^{N} (-\sin(\theta)\,.\,x_i + \cos(\theta)\,.\,y_i + c)^2$$

où N est le nombre de données. Soit f la fonction.
Posons :

$$\frac{\partial^2 f}{\partial c^2}(c_m,\theta_m) = r \qquad \frac{\partial^2 f}{\partial\theta\,\partial c}(c_m,\theta_m) = s \qquad \frac{\partial^2 f}{\partial\theta^2}(c_m,\theta_m) = t$$

D'après le théorème de Monge les minima (c_m,θ_m) de cette fonction vérifient les relations :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial f}{\partial c}(c_m,\theta_m) = 0 \\ \\ \dfrac{\partial f}{\partial \theta}(c_m,\theta_m) = 0 \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{cases} r > 0 \\ s^2 - r.t < 0 \\ t > 0 \end{cases}$$

<u>Dérivées premières : déterminations des extréma</u>

$$\begin{cases} \dfrac{\partial f}{\partial c}(c_m,\theta_m) = \displaystyle\sum_{i=1}^{N} 2.(-\sin(\theta_m)\,.\,x_i + \cos(\theta_m)\,.\,y_i + c_m) = 0 \\ \\ \dfrac{\partial f}{\partial \theta}(c_m\,,\theta_m\,) = \displaystyle\sum_{i=1}^{N} -2.(-\sin(\theta_m)\,.\,x_i + \cos(\theta_m)\,.\,y_i + c).(\cos(\theta_m)\,.\,x_i + \sin(\theta_m)\,.\,y_i) = 0 \end{cases}$$

Ces équations donnent alors les relations suivantes :

$$\boxed{\begin{cases} c_m = -(-\sin(\theta_m).\bar{x} + \cos(\theta_m)\,.\,\bar{y}) \\ \\ \theta_m = \dfrac{\varphi}{2} \quad \left[\dfrac{\pi}{2}\right] \end{cases}}$$

où φ :

$$\cos(\varphi) = \frac{(\sigma_x^2 - \sigma_y^2)}{\text{Norm}} \qquad \text{et} \qquad \sin(\varphi) = \frac{2.\,\text{cov}(x,y)}{\text{Norm}}$$

et :

$$\text{Norm} = \sqrt{(\sigma_x^2 - \sigma_y^2)^2 + 4.\,\text{cov}(x,y)^2}$$

Si l'un de ces extrema est un minimum, l'équation caractéristique de la droite peut se réécrire :

$$-\sin(\theta_m).(x-\bar{x})+\cos(\theta_m).(y-\bar{y})=0$$

On remarque ainsi que le point $\overline{P}\ (\bar{x},\bar{y})$ appartient à cette droite.

<u>Dérivées secondes : détermination des minima</u>

$$\begin{cases} r=\dfrac{\partial^2 f}{\partial c^2}(c_m,\theta_m)=\displaystyle\sum_{i=1}^{N}2=2.N>0 \Rightarrow \text{Valide} \\ s^2=\dfrac{\partial^2 f}{\partial c\,\partial\theta}(c_m,\theta_m)=\dfrac{\partial^2 f}{\partial\theta\,\partial c}(c_m,\theta_m)=\displaystyle\sum_{i=1}^{N}-2.(\cos(\theta_m).x_i+\sin(\theta_m).y_i) \\ t=\dfrac{\partial^2 f}{\partial\theta^2}(c_m,\theta_m)=\dfrac{\partial}{\partial\theta}\left(\displaystyle\sum_{i=1}^{N}-2.(-\sin(\theta_m).x_i+\cos(\theta_m).y_i+c_m).(\cos(\theta_m).x_i+\sin(\theta_m).y_i)\right) \end{cases}$$

Ce qui donne après calcul :

$$\boxed{\begin{cases} c_m=-(-\sin(\theta_m).\bar{x}+\cos(\theta_m).\bar{y}) \\ \theta_m=\dfrac{\varphi}{2}\quad[\pi] \end{cases}}$$

Similairement à la méthode des moindres carrés, un coefficient de détermination peut alors être écrit :

$$R^2=1-\frac{\mathrm{var}\left(\overrightarrow{\overline{P}P_i}.\vec{N}\right)}{\mathrm{var}\left(\overrightarrow{\overline{P}P_i}.\vec{T}\right)}$$

Où $\vec{T}$ est le vecteur directeur de la droite et $\vec{N}$ son vecteur orthogonal direct.

3. Modèle de polymérisation

a. Du microscopique au macroscopique

Les modèles développés dans cette thèse considèrent l'actine comme associée avec seulement l'ATP. La polymérisation ne se faisant que par un bout du filament

(bout barbé), seules deux dynamiques interviennent : l'association et la dissociation de monomères à ce bout caractérisées respectivement par les constantes cinétiques k_{on} et k_{off}.

Dans le cas monodimensionnel, il est possible d'écrire l'évolution de la densité linéique des bouts des filaments par un bilan de conservation de leur nombre. L'axe des abscisses x est défini comme croissant dans le sens de polymérisation des filaments et l'origine correspond au lieu de naissance des filaments. L'apport d'élongation d'un monomère au filament d'actine est noté a. Ainsi, entre deux instants t et t+δt, le nombre de bouts à l'abscisse x est égal à la somme de la différence entre la quantité de bouts ayant polymérisé à la position x-a et x et de la différence entre la quantité de bouts ayant dépolymérisé à la position x+a et x pendant l'instant δt (Eq. 82).

$$\begin{aligned}\rho_B(x,t+\delta t) - \rho_B(x,t) \\ &= \delta t\, k_{on}[\mathrm{Actine_G}]\big(\rho_B(x-a,t) - \rho_B(x,t)\big) \\ &+ \delta t\, k_{off}\big(\rho_B(x+a,t) - \rho_B(x,t)\big)\end{aligned} \qquad \text{Eq. 82}$$

Cette équation peut également se réécrire comme suit.

$$\begin{aligned}2\,\frac{\rho_B(x,t+\delta t) - \rho_B(x,t)}{\delta t} \\ &= -(k_{on}[\mathrm{Actine_G}] - k_{off})\big(\rho_B(x+a,t) - \rho_B(x-a,t)\big) \\ &+ (k_{on}[\mathrm{Actine_G}] + k_{off})\big(\rho_B(x+a,t) - 2\,\rho_B(x,t) + \rho_B(x-a,t)\big)\end{aligned}$$

La méthode des différences finies dans l'approximation des opérateurs par la formulation de Taylor-Young permet de relier la dérivée d'une fonction continue à celle de son homologue discret :

$$\frac{\partial \rho_B}{\partial t}(x,t) = \frac{\rho_B(x,t+\delta t) - \rho_B(x,t)}{\delta t} + o(\delta t)$$

$$\frac{\partial \rho_B}{\partial x}(x,t) = \frac{\big(\rho_B(x+a,t) - \rho_B(x-a,t)\big)}{2\,a} + o(a)$$

$$\frac{\partial^2 \rho_B}{\partial x^2}(x,t) = \frac{\big(\rho_B(x+a,t) - 2\,\rho_B(x,t) + \rho_B(x-a,t)\big)}{2\,a^2} + o(a^2)$$

Ainsi pour des ordres de grandeurs supérieurs, l'évolution temporelle de la densité linéique de bouts s'exprime en fonction de ses dérivées spatiales et de deux constantes v et D assimilables à une vitesse et à une diffusion (Eq. 83).

$$\begin{aligned}\frac{\partial \rho_B}{\partial t}(x,t) &= -v\,\frac{\partial \rho_B}{\partial x}(x,t) + D\,\frac{\partial^2 \rho_B}{\partial x^2}(x,t) \\ v &= a\,(k_{on}[\mathrm{Actine_G}] - k_{off})\end{aligned} \qquad \text{Eq. 83}$$

$$D = a^2\,(k_{on}[\mathrm{Actine_G}] + k_{off})$$

b. Etat stationnaire du modèle à deux populations

L'objectif est de résoudre le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \overline{\rho}_B(0,t) = \rho_{B0} \\ \forall x \in \mathbb{R}_+^* : \; 0 = -v\,\partial_x\,\overline{\rho}_B(x,t) + D\,\partial_x^2\,\overline{\rho}_B(x,t) - k_c\,\overline{\rho}_B(x,t) \\ \partial_t\,\overline{\rho}_{Bc}(x,t) = k_c\,\overline{\rho}_B(x,t) \end{cases}$$

La seconde équation correspond à une équation du deuxième ordre à coefficient constant et sans second membre. Cette équation présente deux racines caractéristiques $\lambda_\pm$:

$$\lambda_\pm = \frac{-v + \sqrt{v^2 \pm 4\,k_c\,D}}{2D}$$

La solution physique impose $\lambda_\pm$ négatif. Ainsi, seule λ_+ est solution de notre système. L'inverse de cette valeur est assimilable à une distance caractéristique $l_0 = 1/\lambda_+$ et la solution générale s'écrit :

$$\overline{\rho}_B(x,t) = N_0 e^{-\frac{x}{l_0}}$$

Avec la condition de bordure (x=0), la densité de bouts dynamiques s'exprime comme :

$$\overline{\rho}_B(x,t) = \rho_{B0}\,e^{-\frac{x}{l_0}}$$

Ainsi, la densité de bouts stabilisés s'écrit également :

$$\overline{\rho}_{Bc}(x,t) = k_c t\,\rho_{B0}\,e^{-\frac{x}{l_0}}$$

Finalement, la densité de filaments d'actine vaut :

$$N_f(x,t) = \rho_{B0}\,l_0\,(1 + k_c\,t)e^{-\frac{x}{l_0}}$$

c. Résolution du modèle à deux populations sans diffusion

L'objectif est de résoudre le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \rho_B(0,t) = \rho_{B0} \\ \forall x \in \mathbb{R}_+^* : \partial_t \rho_B(x,t) = -v\, \partial_x \rho_B(x,t) - k_c\, \rho_B(x,t) \\ \partial_t \rho_{Bc}(x,t) = k_c\, \rho_B(x,t) \end{cases}$$

La solution peut être calculée en passant dans le domaine fréquentiel spatial. Les transformées usuelles suivantes sont utilisées :

$$\hat{f}(s,t) = \int_0^{+\infty} f(x,t)\, e^{-sx}\, dx$$

$$\partial_x \hat{f}(s,t) = \int_0^{+\infty} \partial_x f(x,t)\, e^{-sx} dx = s\, \hat{f}(s,t) - f(0,t)$$

$$\partial_x^2 \hat{f}(s,t) = \int_0^{+\infty} \partial_x^2 f(x,t)\, e^{-sx} dx = s^2\, \hat{f}(s,t) - \partial_x f(0,t) - s\, f(0,t)$$

Après transformation, l'équation maîtresse s'écrit :

$$\partial_t \hat{\rho}_B(s,t) = -(k_c + vs)\, \hat{\rho}_B(s,t) - v\, \rho_B(0,t)$$

Or $\rho_B(0,t) = \rho_{B0}$, la solution est alors de la forme suivante :

$$\hat{\rho}_B(s,t) = \frac{v\, \rho_{B0}}{vs + k_c} \left(1 - e^{-\frac{t}{k+vs}}\right)$$

Après transformation inverse :

$$\rho_B(x,t) = \rho_{B0}\, e^{-\frac{k_c}{v} x}\, U(vt - x)$$

Où U est la fonction de Heaviside (fonction échelon). Il est ainsi possible de calculer la quantité de bouts statiques :

$$\rho_{Bc}(x,t) = \int_0^t k_c\, \rho_B(x,u)\, du$$

$$\rho_{Bc}(x,t) = \rho_{B0}\, k_c\, e^{-\frac{k_c}{v} x} \int_0^t U(vu - x)\, du$$

$$\rho_{Bc}(x,t) = \rho_{B0}\, k_c\, e^{-\frac{k_c}{v}x} \int_{\frac{x}{v}}^{t} U(vu - x)\, du$$

$$\rho_{Bc}(x,t) = \rho_{B0}\, k_c\, e^{-\frac{k_c}{v}x} \int_{\frac{x}{v}}^{t} U(vt - x)\, du$$

$$\rho_{Bc}(x,t) = \rho_{B0}\, k_c\, e^{-\frac{k_c}{v}x} \left(t - \frac{x}{v}\right) U(vt - x)$$

Ainsi le nombre de bouts total s'écrit :

$$\rho_{Btot} = \rho_{B_0}\, e^{-\frac{k}{v}x} \left(1 + k\left(t - \frac{x}{v}\right)\right) U(vt - x)$$

Le nombre de filaments en une position x s'écrit alors :

$$N_f(x,t) = \int_{x}^{+\infty} \rho_{Btot}(u,t)\, du$$

$$N_f(x,t) = \int_{x}^{+\infty} \rho_{B_0}\, e^{-\frac{k}{v}u} \left(1 + k\left(t - \frac{u}{v}\right)\right) U(vt - u)\, du$$

$$N_f(x,t) = \rho_{B_0} \left((1 + kt) \frac{-v}{k}\, e^{-\frac{k}{v}u} \Big]_{x}^{vt} - \frac{k}{v} \int_{x}^{vt} u\, e^{-\frac{k}{v}x'}\, du \right) U(vt - x)$$

$$N_f(x,t) = \rho_{B_0} \left(-\left(\frac{v}{k} + vt\right) \left(e^{-kt} - e^{-\frac{k}{v}x}\right) + u\, e^{-\frac{k}{v}u} \Big]_{x}^{vt} - \int_{x}^{vt} e^{-\frac{k}{v}u}\, du \right) U(vt - x)$$

$$N_f(x,t) = \rho_{B_0} \left(-\left(\frac{v}{k} + vt\right) \left(e^{-kt} - e^{-\frac{k}{v}x}\right) + \left(v\, t\, e^{-kt} - x\, e^{-\frac{k}{v}x}\right) + \frac{v}{k} e^{-\frac{k}{v}u} \Big]_{x}^{vt} \right) U(vt - x)$$

$$N_f(x,t) = \rho_{B_0} \left(-\frac{v}{k} e^{-kt} + \left(\frac{v}{k} + vt - x\right) e^{-\frac{k}{v}x} + \frac{v}{k}\left(e^{-kt} - e^{-\frac{k}{v}x}\right) \right) U(vt - x)$$

$$N_f(x,t) = \rho_{B_0}(vt - x) e^{-\frac{k}{v}x}\, U(vt - x) \qquad \text{Eq. 84}$$

d. Validation du simulateur Matlab®

Pour valider les simulations générées sous Matlab®, la solution analytique du modèle développée en collaboration avec Frank JÜLICHER (MPIPKS) et Carles BLANCH MERCADER (post-doctorant de l'UMR 168) (Eq. 47) est comparée à sa simulation (Figure 121). La correspondance est parfaite.

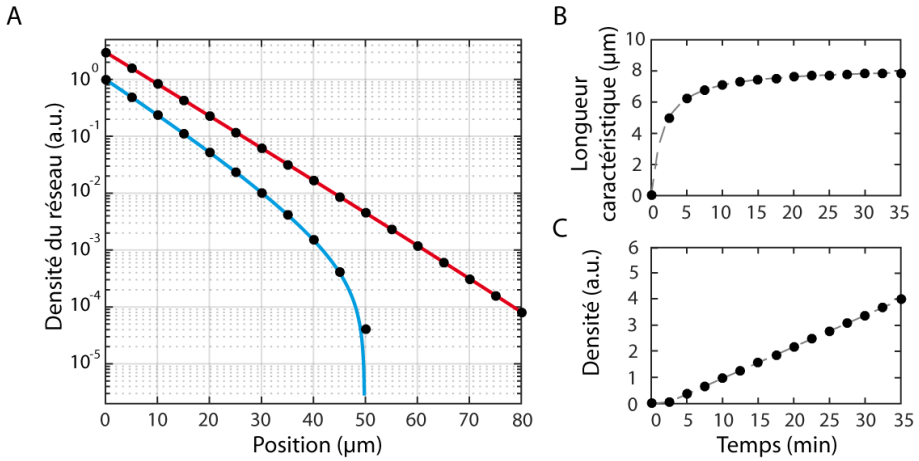


Figure 121 : Comparaison entre de la solution analytique et la simulation des équations Eq. 47. Lignes : le modèle. Cercles pleins : la simulation. En l'abscisse x= 0, à chaque instant t, le nombre de bouts est constant. La concentration en monomères d'actine est considérée égale à 4 µM. Le système inclut la consommation de monomères. Les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} sont imposées respectivement à 8 µM.s^{-1} et 2 s^{-1}. Le taux de coiffe des filaments est fixé à 2,7 µM^{-1}.s^{-1}.A : Profils du réseau à la 10ième et (bleu) et à la 30ième (rouge) minute de polymérisation. B : Evolution temporelle de la longueur caractéristique du réseau estimée à l'origine. C : Evolution de la densité du réseau estimée à une distance de x= 10 µm de la ligne de nucléation.

4. Le MSD dans un milieu confiné

Le but de cette partie est de relier la saturation du MSD de particules diffusant dans un milieu confiné ('boîte') aux dimensions du milieu. Nous nous plaçons dans une géométrie unidimensionnelle. Supposons un canal de largeur L dans lequel nous injectons une solution de billes. Les propriétés viscoélastiques du milieu sont supposées constantes et uniformes ; le nombre de billes est suffisant pour effectuer une statistique continue. La probabilité de trouver une bille à un instant t à un endroit x du canal est constante :

$$\forall t \in \mathbb{R}, \quad P_x\big(x(t)\big) = P_x(x) = \begin{cases} \frac{1}{L} \text{ si } |x| < L \\ 0 \text{ sinon} \end{cases}$$

La probabilité de déplacement Δx qu'effectue une bille entre deux instants suffisamment éloignés (ie : par diffusion la bille a pu explorer tout l'espace du canal $\sqrt{D\,\tau} \gg L$, où D est le coefficient de diffusion de la particule) s'écrit :

$$P\big(\Delta x(\tau)\big) = P_x * P_x(\Delta x(\tau))$$

$$P\big(\Delta\, x(\tau)\big) = \int_{-\infty}^{+\infty} P_x\big(\Delta x(t+\tau) - x(t)\big).\, P_x\big(x(t)\big)\,.\, dx(t)$$

$$P\big(\Delta\, x(\tau)\big) = \frac{1}{e}\,.\int_{-\frac{L}{2}}^{+\frac{L}{2}} P_x\big(\Delta x(\tau) - x(t)\big).\, dx(t)$$

$$P\big(\Delta\, x(\tau)\big) = \begin{cases} \dfrac{L + \Delta\, x(\tau)}{L^2} & \text{si } 0 > \Delta\, x(\tau) > -L \\[2ex] \dfrac{L - \Delta\, x(\tau)}{L^2} & \text{si } e > \Delta\, x(\tau) > L \\[2ex] 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

Ainsi, pour des temps longs, le MSD de l'ensemble des billes s'écrit :

$$\lim_{\infty} MSD(\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} P\big(\Delta\, x(\tau)\big).\, \Delta\, x(\tau)^2\,.\ d\Delta\, x(\tau)$$

$$\lim_{\infty} MSD(\tau) = 2\,.\int_{0}^{L} P\big(\Delta\, x(\tau)\big).\, \Delta\, x(\tau)^2\,.\ d\Delta\, x(\tau)$$

$$\lim_{\infty} MSD(\tau) = 2\,.\int_{0}^{L} \Delta\, x(\tau)^2.\left(\frac{L - \Delta\, x(\tau)}{L^2}\right)\,.\ d\Delta\, x(\tau)$$

$$\lim_{\infty} MSD(\tau) = 2\,.\left(\frac{\Delta\, x(\tau)^3}{3.\,L} - \frac{\Delta\, x(\tau)^4}{4.\,L^2}\right)\Bigg]_0^L$$

$$\lim_{\infty} MSD(\tau) = 2\,.\left(\frac{L^3}{3.\,L} - \frac{L^4}{4.\,L^2}\right) = 2.\,L^2\,.\left(\frac{1}{3} - \frac{1}{4}\right)$$

$$\lim_{\infty} MSD(\tau) = \frac{L^2}{6}$$

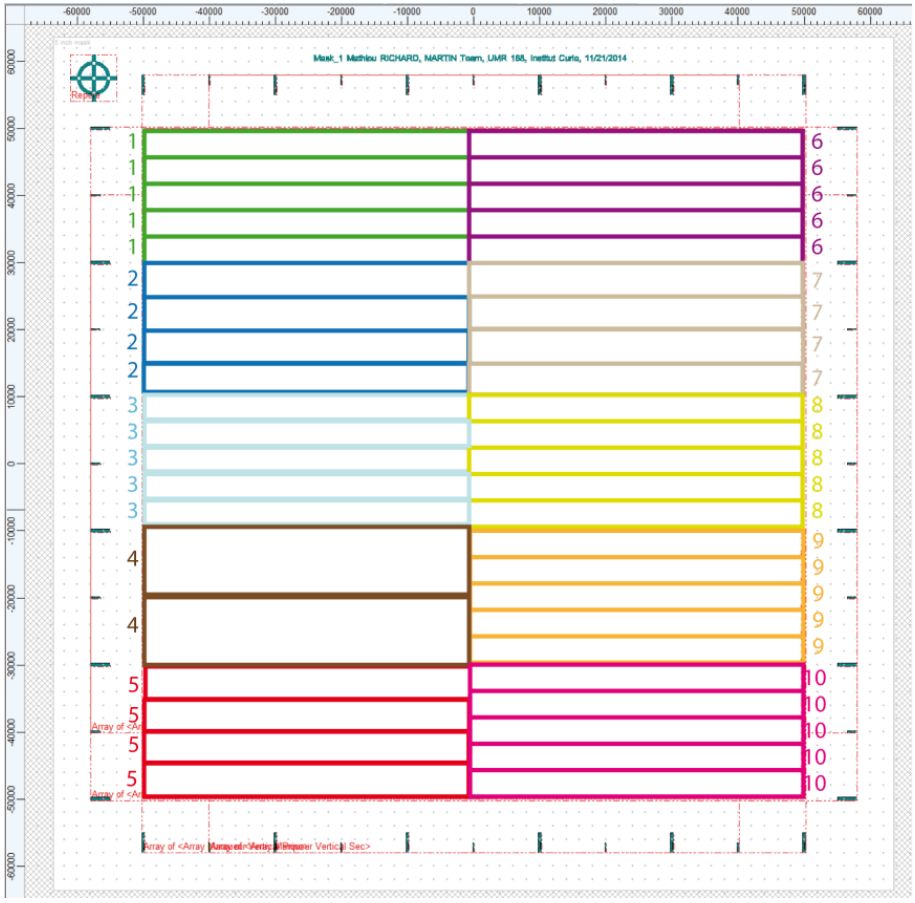
C Insolation UV

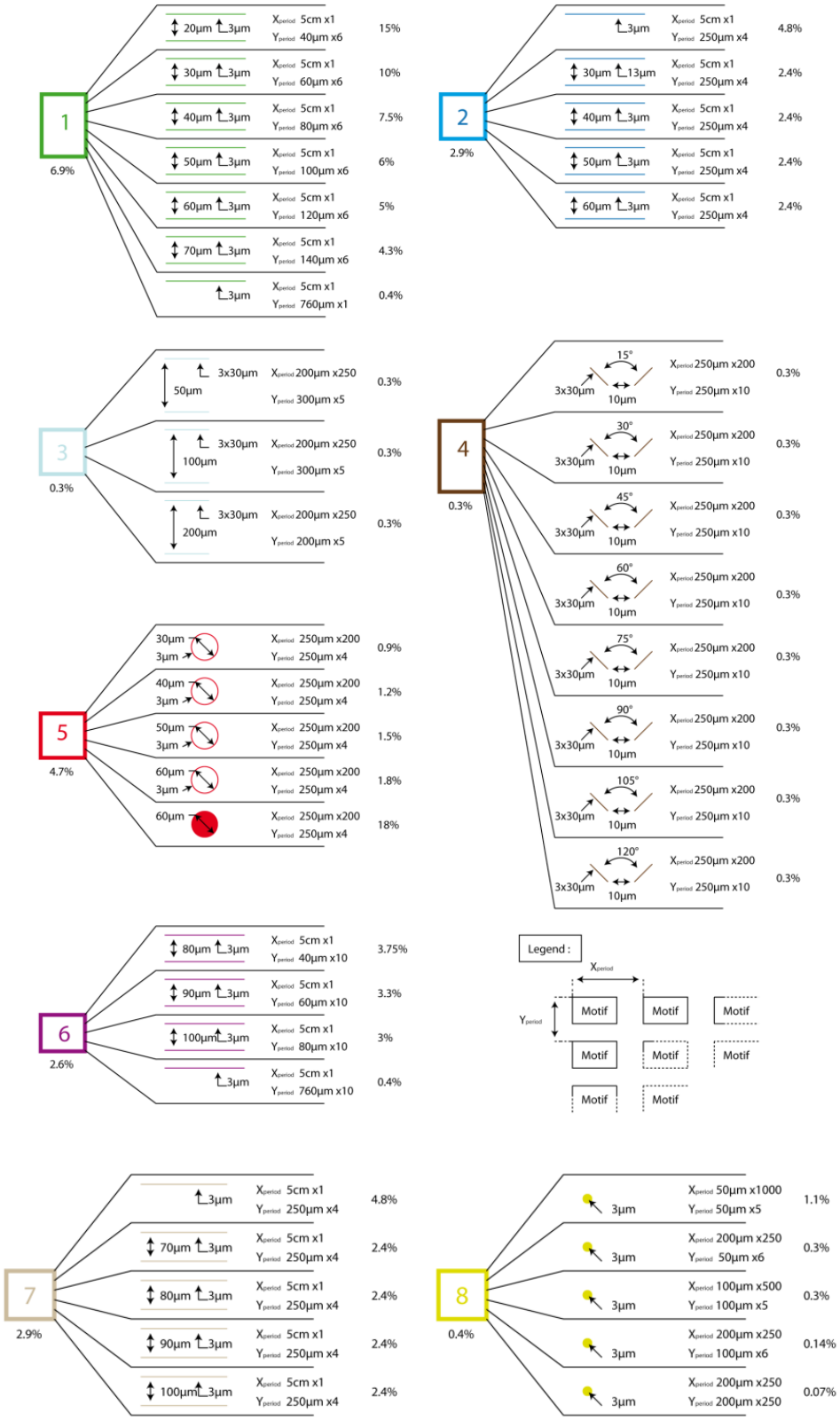
1. Masque de chrome

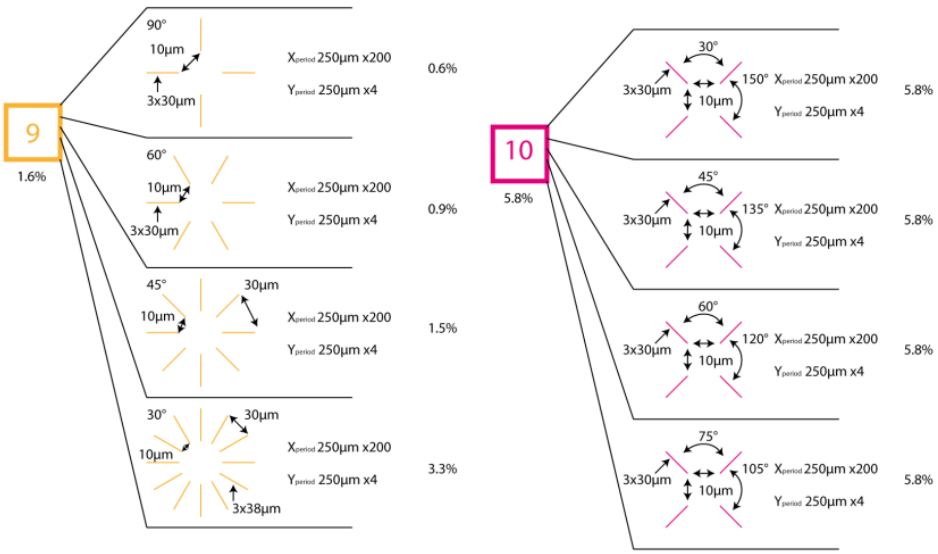
Les plans des masques de chrome sont dessinés à l'aide du logiciel CleWin. Les masques de chrome sont ensuite produits par la société Toppan avec un grade (précision) B.

a. Mask1

Ce premier masque comporte 10 différentes zones où les motifs sont répétés. Les zones 1-2-3-6-7 sont des segments parallèles d'épaisseur 3 µm mais de longueur et d'espacement entre elles variables. Les zones 4-9-10 représentent des segments inclinés également d'épaisseur 3 µm. Quant à la zone 5, elle comporte des cercles de différents diamètres. Enfin la zone 8 dessine des motifs ponctuels. Sur les schémas descriptifs ci-dessous sont indiqués en % les taux de surface occupés par les motifs. Ces taux sont explicités par zone et par type de motifs.

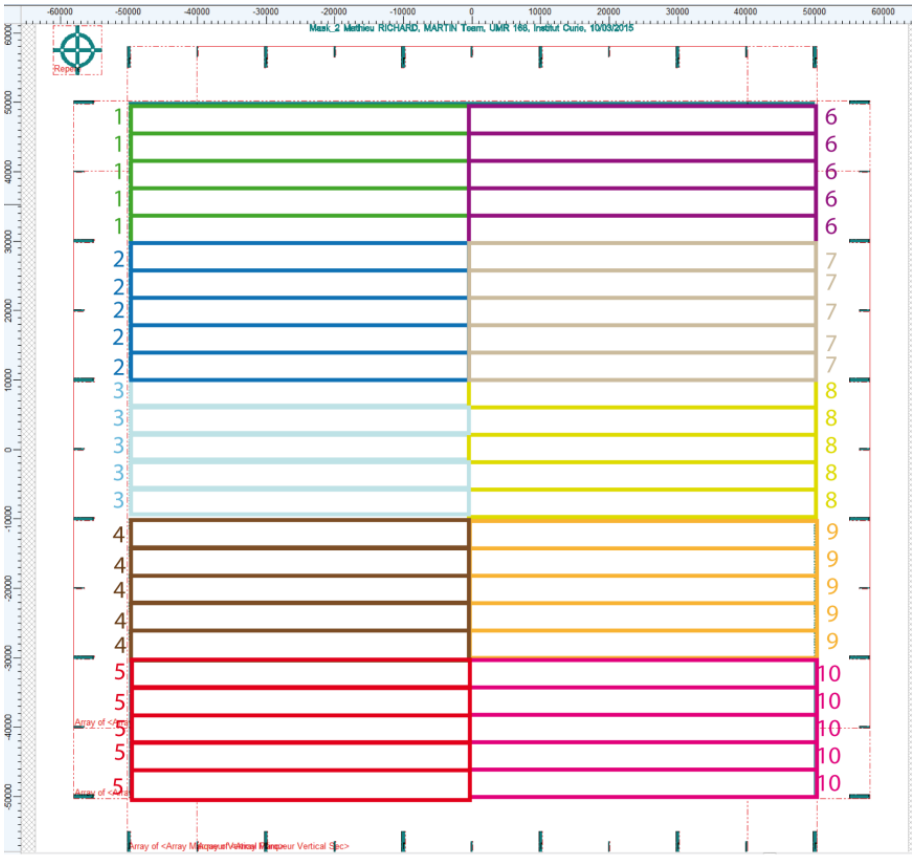



1
6.9%
20µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 40µm x6 15%
30µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 60µm x6 10%
40µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 80µm x6 7.5%
50µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 100µm x6 6%
60µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 120µm x6 5%
70µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 140µm x6 4.3%
3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 760µm x1 0.4%
2
2.9%
3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 4.8%
30µm 13µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
40µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
50µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
60µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
3
0.3%
50µm 3x30µm Xperiod 200µm x250 Yperiod 300µm x5 0.3%
100µm 3x30µm Xperiod 200µm x250 Yperiod 300µm x5 0.3%
200µm 3x30µm Xperiod 200µm x250 Yperiod 200µm x5 0.3%
4
0.3%
15° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
30° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
45° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
60° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
75° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
90° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
105° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
120° 3x30µm 10µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x10 0.3%
5
4.7%
30µm 3µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x4 0.9%
40µm 3µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x4 1.2%
50µm 3µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x4 1.5%
60µm 3µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x4 1.8%
60µm Xperiod 250µm x200 Yperiod 250µm x4 18%
6
2.6%
80µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 40µm x10 3.75%
90µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 60µm x10 3.3%
100µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 80µm x10 3%
3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 760µm x10 0.4%
Legend :
Xperiod
Yperiod
Motif
Motif
Motif
Motif
Motif
Motif
Motif
Motif
7
2.9%
3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 4.8%
70µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
80µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
90µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
100µm 3µm Xperiod 5cm x1 Yperiod 250µm x4 2.4%
8
0.4%
3µm Xperiod 50µm x1000 Yperiod 50µm x5 1.1%
3µm Xperiod 200µm x250 Yperiod 50µm x6 0.3%
3µm Xperiod 100µm x500 Yperiod 100µm x5 0.3%
3µm Xperiod 200µm x250 Yperiod 100µm x6 0.14%
3µm Xperiod 200µm x250 Yperiod 200µm x250 0.07%

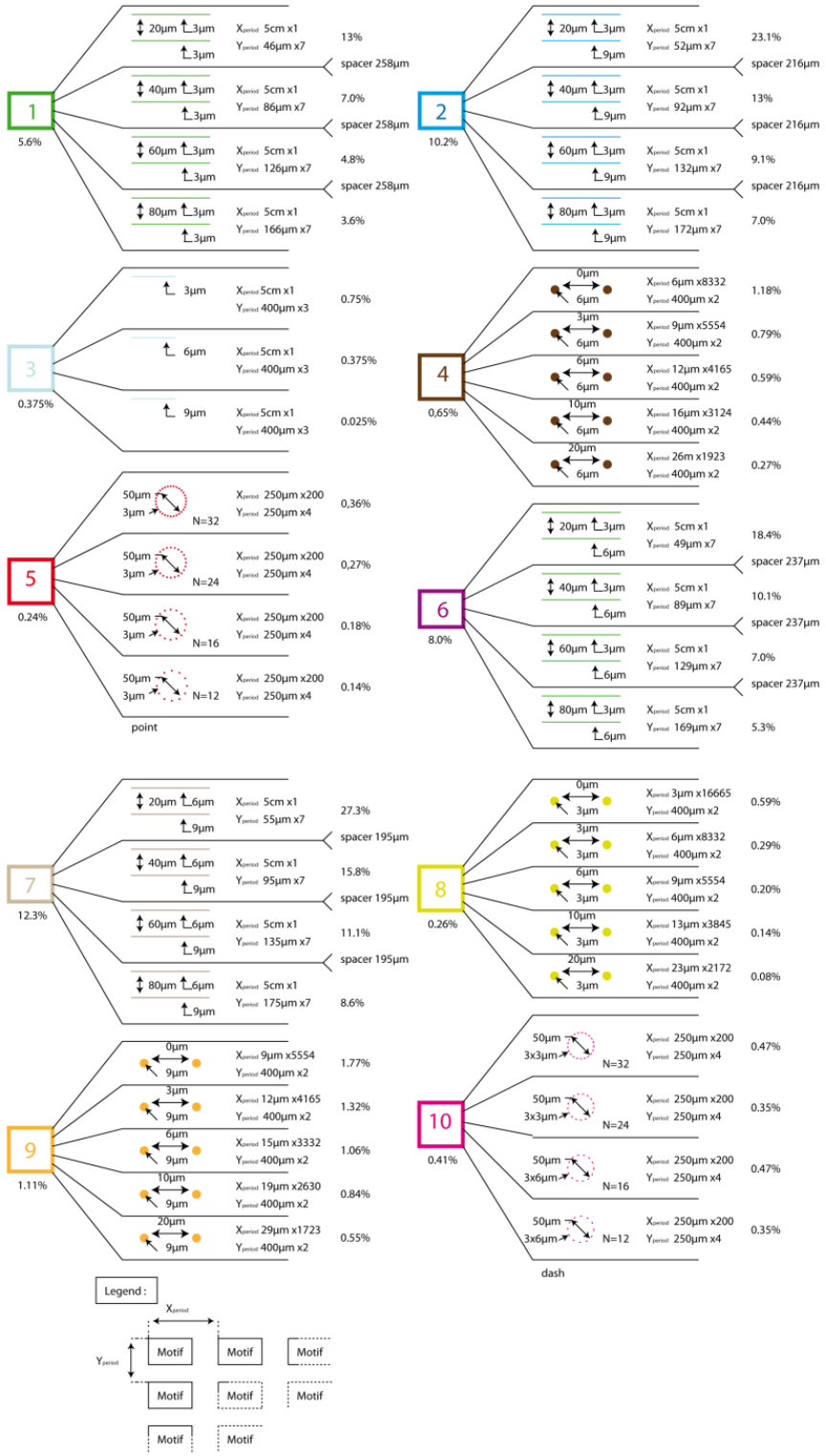


b. Mask2

Ce deuxième masque comporte 10 différentes zones où les motifs sont répétés. Les zones 1-2-3-6-7 sont des lignes parallèles d'épaisseur et d'espacement entre elles variables. Les zones 4-8-9 représentent des réseaux de points de diamètre variable. Quant aux zones 5 et 10, elles comportent respectivement des points et des segments disposés en cercle.

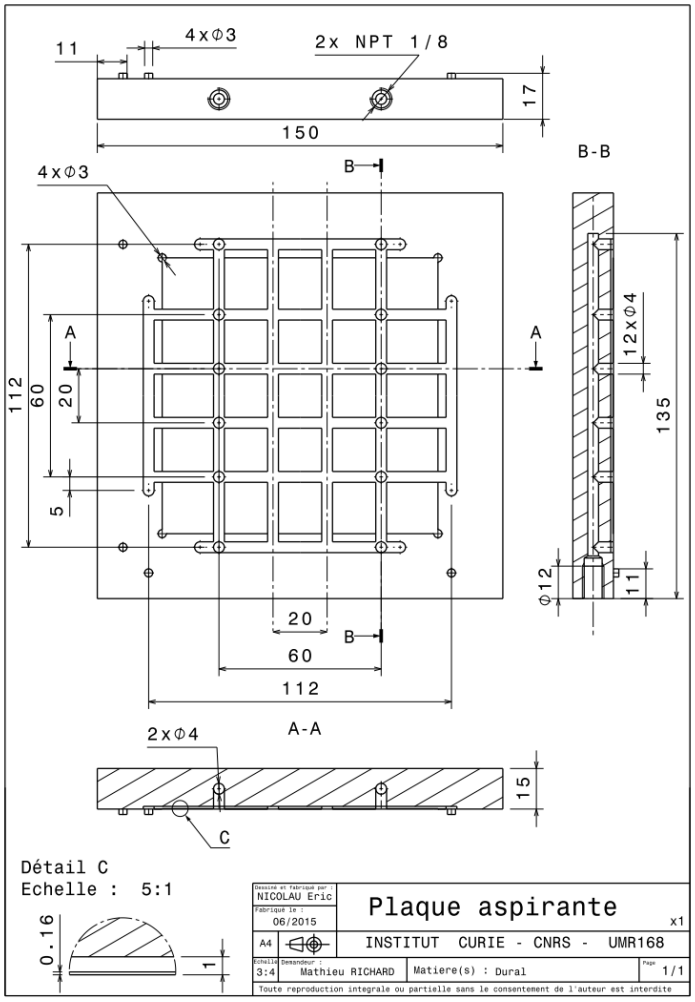


Sur les schémas descriptifs ci-dessous sont également indiqués en % les taux de surface occupés par les motifs.



2. Instrument de plaquage

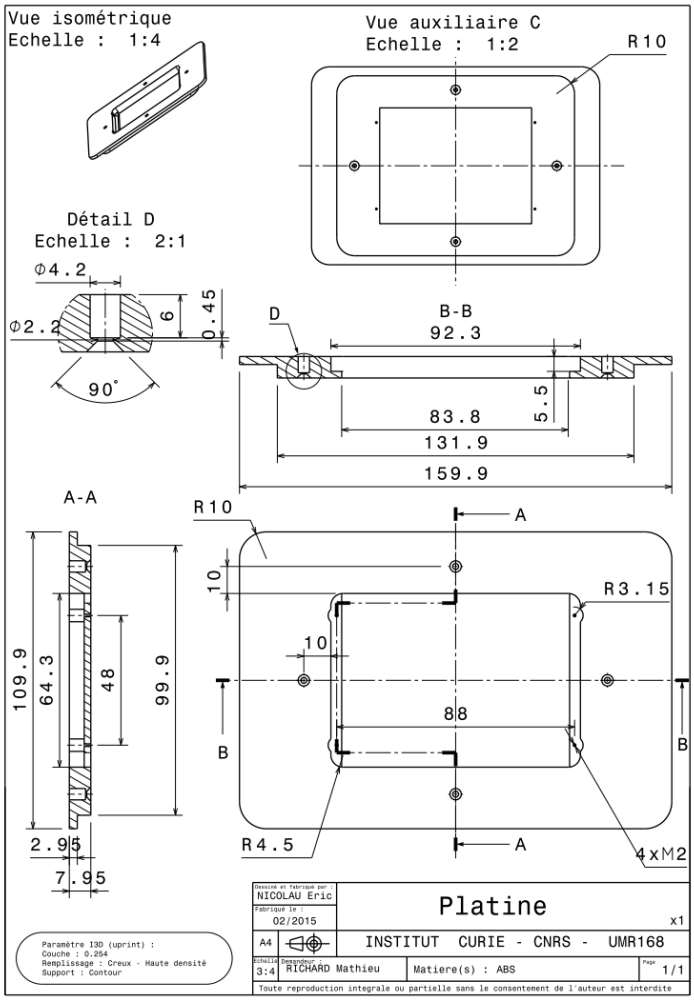
Pour assurer un espace minimal entre la lamelle de verre et le masque de chrome, la lamelle est plaquée sur ce dernier par le vide. Pour se faire, une plaque aspirante en dural a été usinée dans notre laboratoire (Eric NICOLEAU, Plateforme de construction mécanique de l'UMR 168). Le vide est alors généré avec une pompe VP 100 (vwr, ref 181-0235).



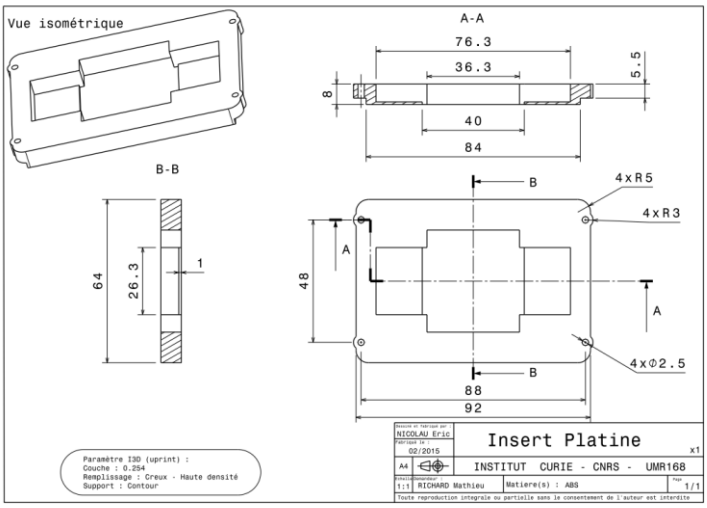
D Positionnement et contrôle de la température de l'échantillon

1. Le porte échantillon (création imprimante 3D)

Pour réguler la température, nous utilisons un contrôleur par effet Peltier (voir page 172). Aucun porte échantillon n'étant adapté, nous avons créé le notre (voir figure ci-dessous) à l'aide d'une imprimante 3D (Eric NICOLEAU, Plateforme de construction mécanique de l'UMR 168). Le système de régulation de température est alors plaqué sur la plateforme à l'aide de valets pour microscope (ref 574167TS, le laborantin).



Un porte échantillon (voir figure ci-dessous) de la même dimension que le système de régulation de température a été usiné. Ainsi, la plateforme modulaire peut être utilisée avec ou sans régulateur.



Sur ces schémas, il n'y a pas de système de fixation de la plateforme au microscope. L'inconvénient est la possibilité d'une dérive de la plateforme au cours du

temps. Récemment, des aimants ont été incrustés dans la plateforme (ref : 343-6827, radiospare) pour résoudre ce problème.

2. Système de régulation de température

Pour maintenir nos expériences à 27°C, nous utilisons un système de régulation de température par effet Peltier (Figure 122).

Figure 122 : système de régulation de température par effet Peltier de Warner Instrument. A : Porte échantillon composé d'un système Peltier (Thermal Insert (TB-3 CCD)). B : Système électronique de régulation de la température (Bipolar temperature controler (CL-100)). C : Système hydraulique (Liquid cooling system (LCS-1)).

E Produits, tampons, solutions et protocoles

1. Produits et condition de stockage

Produit	Référence	Quantité	Stockage	Tampon	pH *	Durée de vie
EGTA**	E4378 – Sigma	0,5 M	RT	H_2O	7,8	6 mois
Na_2EDTA**	ED2SS – Sigma 1310-B Euromedex	0,5 M	RT	H_2O	7,8	6 mois
Imidazole	$C_3H_4N_2$ – Fluka I-0125 - Sigma	0,2 M	RT	H_2O	7,8	6 mois
Tris-Cl	T-3253 - Sigma	0,2 M	RT	H_2O	8	6 mois
$MgCl_2$	?	1 M	RT***	H_2O	x	6 mois
Méthylcellulose	M-0512 - Sigma	4000 cPs	RT***	H_2O	x	6 mois
Bille	F8807 – Life Tech	1‰ w/w	4°C	H_2O	x	x
BSA	A3059-10G - Sigma	10% w/w	-20°C	H_2O	x	6 mois
DTT	EU0006-B Euromedex	1 M	- 20°C	H_2O	7,8	6 mois
Glucose	24 379.294 Rectapur	55,5 mM	- 20°C	H_2O	x	6 mois
Na_2ATP	A2383 - Sigma	0,1 M	- 20°C	H_2O	x	6 mois
$CaCl_2$	Sigma	50 mM	- 20°C	H_2O	x	6 mois
Phalloïdine fluo	P12380 – Life Tech	100 µM	- 20°C	Méthanol	x	1 an
Glucose oxydase	G7141 – Sigma	875 Units/ml	- 20°C	KMEI	x	1 an
Catalase	C100 – Sigma	3500 Units/ml	- 20°C	KMEI	x	1 an
Complexe Arp2/3	RP01P – Tebu-Bio	22,3 µM	- 80°C	Datasheet	x	6 mois
Profiline	J. Manzi, UMR168	2 mM	- 80°C		x	2-3 ans
Strep-pWA-His	J. Manzi, UMR168	35 µM	- 80°C		x	
Actine G	AKL99 B – Tebu-Bio	232 µM	- 80°C	Datasheet	x	6 mois
Actine G fluo	A12374 Life Tech	240 µM	- 80°C	Datasheet	x	6 mois

Tab. A. 1 : liste des produits stockés. * : les pH sont ajustés avec le couple (NaOH, HCl). ** : Ces produits sont solubles dans des solutions de pH supérieur à 6. *** : ces produits sont généralement conservés à 4°C afin d'être à la même température que la solution d'injection. Tous les produits conservés à -20°C sont décongelés sur glace.

2. Composition des tampons

Produit	Quantité
Tris-Cl	2 mM
Na_2ATP	0,2 mM
DTT	0,5 mM
$CaCl_2$	0,1 mM
NaAzide*	0 mM

Tab. A. 2 : tampon G (Globule). * Le NaAzide permet de ralentir la progression de bactérie. Au laboratoire de Laurent Blanchoin il est ajouté à hauteur de 1 mM. Stockage : -

Produit	Quantité
KCl	0,8 M
EDTA	0,1 mM
EGTA	10 mM
Imidazole	0,1 M

Tab. A. 4 : tampon 10xKEEI. La dilution en 1xKEEI se fait avec du tampon G. Stockage : -20°C.

20°C.

Produit	Quantité
KCl	0,5 M
$MgCl_2$	10 mM
EGTA	10 mM
Imidazole	0,1 M

Tab. A. 3 : tampon 10xKMEI. La dilution en 1xKMEI se fait avec du tampon G. Stockage : -20°C.

Produit	Quantité
KCl	80 mM
EDTA	10 µM
EGTA	1 mM
Imidazole	10 mM
Na_2ATP	5 mM
$MgCl_2$	5 mM
DTT	2 mM

Tab. A. 5 : tampon M (myosine). Sa conception se fait à partir d'une base de 1xKEEI à laquelle sont ajoutés les trois ingrédients manquants. Durée de vie : 1 jour.

3. Les solutions

a. Polymérisation sur motif

Produit stock	Quantité	Concentration
H_2O	9 µl	
$MgCl_2$	1 µl	50 mM
Na_2ATP	10 µl	50 mM

Tab. A. 6 : Tableau de préparation de la solution MgATP. Volume totale : 18 µl. Durée de vie : 1 jour.

Produit stock	Quantité	Concentration
Tampon G	17 µl	
10xKMEI	25 µl	1x
Glucose oxydase	8 µl	14 Units/ml
Catalase	8 µl	112 Units/ml
Na_2ATP	5 µl	2 mM
DTT	42 µl	168 mM
Méthylcellulose	141 µl	2300 cPs

Tab. A. 7 : Tableau de préparation du Tampon de Fluorescence (TF). L'injection des produits se fait par ordre d'apparition dans le tableau. Pour la méthylcellulose, une pointe de pipette de 200 µl doit être coupée d'environ 3 mm afin de pouvoir correctement aspirer le produit visqueux. A cause de cette viscosité la solution doit être abondamment mélangée. Volume total : 250 µl. Durée de vie : 1 jour.

Produit stock	Quantité	Concentration
Tampon G	10 µl	
Actine G fluo*	1,8 µl	20 µM – 20%
Actine G*	6,2 µl	20 µM – 80%

Tab. A. 8 : Tableau de préparation du mélange d'actine G (Globule). * : l'actine marquée (respectivement non marquée) est préalablement diluée à 40 µM (respectivement 46,4 µM) dans du tampon G. Volume total : 18 µl. Durée de vie : 4 semaines.

Produit stock	Quantité	Concentration
Tampon G	1,6 µl	
10xKMEI	6 µl	1x
BSA*	2 µl	1‰
Complexe Arp 2/3*	2 µl	10 nM
Profiline*	2 µl	12 µM
MgATP	2,4 µl	2 mM
TF	20 µl	Ratio 1:3
Billes fonctionnalisées	12 µl	Max 0,6 millions/µl
Actine 20%	12 µl	4 µM

Tab. A. 9 : Tableau de préparation de la solution d'injection. L'injection des produits se fait par ordre d'apparition dans le tableau. * : le complexe Arp 2/3 (resp. profiline, BSA) est préalablement dilué à 300 nM (resp. 360 µM, 3%) dans du 1xKMEI. Volume total : 60 µl. Durée de vie sans les billes et l'actine : quelques heures.

b. Essai de motilité

Produit stock	Quantité	Concentration
Tampon Filament	16,7 µl	
Actine G*	2,2 µl	5 µM
Phalloïdine fluo	1,1 µl	5,5 µM

Tab. A. 10 : Tableau de préparation de la solution Actine F (Filament). * : l'actine non marquée est préalablement diluée à 46,4 µM dans du tampon G. Volume total : 20 µl. Durée de vie : 2 semaines.

Produit stock	Quantité	Concentration
Tampon G	28,9 µl	
10xKMEI	5 µl	1x
Glucose oxydase	2,9 µl	50 Units/ml
Catalase	5,7 µl	400 Units/ml
DTT	2,5 µl	50 mM
Glucose	2 µl	22,2 mM
Na_2ATP	1 µl	2 mM
Actin F*	2 µl	4 nM

Tab. A. 11 : Tableau de préparation de la solution finale. L'injection des produits se fait par ordre d'apparition dans le tableau. * : l'actine est préalablement diluée à 100 nM dans du tampon Filament. Inspiré du protocole du laboratoire de MICHAEL OSTAP (http://www.med.upenn.edu/ostaplab/protocols.shtml). Volume total : 50 µl. Durée de vie sans l'actine, l'ATP et le Glucose : quelques heures.

4. Protocoles

a. Billes PEG

PEG-coated particles - Mathieu

28/07/15

Method is from Valentine, Bead Surface Chemistry & Tracking, Biophys paper – I have made changes to this as some thins were strange.

- Beads: FluoSpheres® Carboxylate-Modified Microspheres, 0.2 µm, dark red fluorescent (660/680), 2% solids - 2% w/w (Catalog No: F-8807)
- Current bead concentration = 4,54 x10^{12} beads/m^2
- Buffers – Make Stocks: 1M MES pH 6,0 (MW = 195,2) – 97,6g/500mL
  2X Borate Buffer pH 8,5: 50 mM Boric Acid mW = 61,83, 36mM Sodium Tetraborate = 201,22
  - Difficult to disolve. Made a 2x stock and diluted accordingly for each buffer
  EDC – 191,7 g/mol NHS – 217,3 g/mol mPEG-NH_2 – 2000 Da (g/mol)

- Load 10µL of Spheres/Beads into dialysis cup. Stock = 4,8x10^{10} beads – use 10µL of beads for 1 experiment
  - Paper uses 10^{11}- 10^{13} particles/mL - Higher densities than this can result in aggregation and poor coupling efficiency.
  - $N = \frac{V}{\frac{4}{3}\pi r^3}$ V=% x Volume

- Day 1: Dialyse in 25mL 100mM MES, pH 6.0 Buffer overnight at 4°C.

- Day 2: Dialyse into 25mL 100mM MES, pH 6,0, 15 mM EDC (70mg), 5 mM NHS (28mg) and a 8mM (10-fold excess) mPEG-NH_2 (400mg) for 4H
  - mPEG-NH_2 concentration was calculated using Jonathans method. We do not know how many Carboxylate groups there are per particle. This information was not available to us.
  - Both the EDC and NHS are in vast excess. The concentrations may be varied slightly without loss of coupling efficiency; however, using significantly higher concentrations of either reagent may accelerate the loss of charge stability and promote aggregation.

- Dialyse into Borate Buffer (50 mM Boric Acid, 36mM Sodium Tetraborate) pH 8.5, 5 mM NHS and 8 mM mPEG-NH_2 (10-fold excess) under agitation, for 8H - overnight

- Day 3-4: Repeat twice with fresh buffer and reagents.

- 31/07/15 - Dialyse into Borate Buffer pH 8,5 for at least 6H to remove any unreacted reagents and polymers.

- Recover beads and stored at 4°C - They are stable for several months.

- Final bead volume = 250µL
  - The dialysis increased the volume of the sample, but I'm not sure why it increased it by 25 times. There seemed to be no leaks as the beads stayed in the tube.
- Samples have been given to Mathieu to test.

b. Protocole global de préparation des réseaux de filaments d'actine

Au minimum deux jours avant l'expérience, les monomères d'actine marquée et non marquée sont décongelés sur glace. Les deux mélanges sont dilués dans du tampon G en respectant le pourcentage de marqueur souhaité (Tab. A. 8). La conservation se fait sur glace.

Pour gagner du temps, les lamelles de PLL-g-PEG non insolées sont préparées la veille. Pour la même raison, suffisamment de tampons en 10x ou en 1x sont prévus notamment du 1xKMEI frais pour le rinçage des lamelles après dépôts de pWA.

Le jour de l'expérience, les produits nécessaires sont décongelés sur glace :

- ATP (-20°C)
- BSA (-20°C)
- Catalase (-20°C)
- DTT (-20°C)
- Glucose (-20°C)
- Glucose oxydase (-20°C)
- Complexe Arp 2/3 (-80°C)
- pWA (-80°C)

Tout d'abord, la solution de MgATP (Tab. A. 6) est préparée, suivie du tampon de fluorescence (Tab. A. 7), pour finir par la solution d'injection (Tab. A. 9) dépourvue de myosine ou d'actine. En parallèle les lamelles PLL-g-PEG sont fonctionnalisées et les canaux de polymérisation créés.

Le moment venu, les éléments restant sont ajoutés et la solution est injectée dans le canal. Enfin le canal est scellé.

Toutes les préparations de ces solutions sont décrites dans l'annexe (Annexe page 173).

F Principe du 'test pyrène' (dynamique de polymérisation de l'actine)

Le sulfhydryle N-(1-Pyreny1)iodoacetamide –appelé communément le 'pyrène'– forme une liaison covalente avec la cystéine Cys-374 du monomère d'actine. Il s'agit d'un marqueur fluorescent (longueur d'onde d'excitation : 365nm ; longueur d'onde d'émission : 407nm) qui présente la particularité d'être 25 fois plus fluorescent quand l'actine est sous forme filamenteuse que lorsqu'elle est sous forme globulaire (Kouyama et al. 1981 ; Figure 123). Cette propriété permet de caractériser la dynamique de polymérisation de l'actine en suivant l'évolution temporelle du signal de fluorescence. Le pyrène n'altère pas les propriétés de l'actine (Cooper et al. 1983).

L'évolution temporelle I(t) du signal de fluorescence au cours de la polymérisation permet d'estimer la vitesse de nucléation, c'est-à-dire le nombre de bouts barbés qui apparaît par unité de temps et de volume (en nM/min) en début de polymérisa-

tion, la vitesse de polymérisation des filaments et le nombre total de bouts barbés (par unité de volume) qui a été formé à la mi-parcours. L'échelle du signal de fluorescence SF est donnée par

$$\mathbf{SF} = \frac{\mathbf{A_{G0}} - \mathbf{A_{GC}}}{\mathbf{I_{max}} - \mathbf{I_{min}}} \qquad \text{Eq. 85}$$

où I_{max} correspond à l'intensité maximale du signal de fluorescence qui est obtenue à l'état stationnaire quand la concentration en actine globulaire libre est égale à la concentration critique A_{GC} (fin du processus de polymérisation) et I_{min} est l'intensité minimale du signal de fluorescence mesuré au début de l'expérience quand la concentration en actine globulaire est A_{G0} (Doolittle et al. 2013).

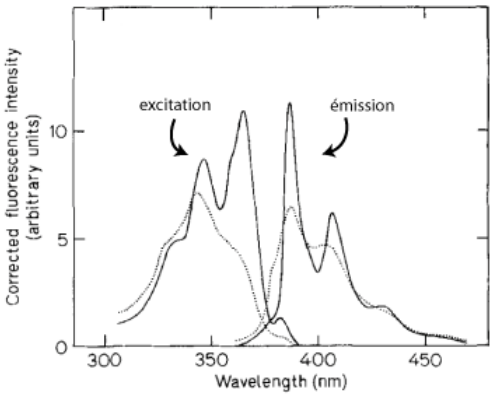


Figure 123 : Spectre d'excitation/émission de l'actine-pyrène sous forme filamenteuse (- ; ligne épaisse) et globulaire (-- ; ligne fine) (Kouyama et al. 1981).

A tout instant, la vitesse de polymérisation AP (=d[Actine]$_F$/dt)) est le produit de la concentration B_e de bouts barbés par la vitesse de polymérisation v d'un filament ; cette dernière est fonction de la concentration [Actine]$_G$ d'actine globulaire :

$$\mathrm{AP} = \mathrm{B_e}\ \mathrm{v}([\mathrm{Actine}]_G)$$

où $v=k_{on}[\text{Actine}]_G-k_{off}$ (voir page 11).

Convenir qu'il existe une constante cinétique de nucléation NR revient à dire que le nombre de bouts barbés croît proportionnellement au temps :

$$\mathrm{B_e} = \mathrm{NR}\ \mathrm{t}$$

En supposant que le processus de polymérisation est dominé par la dynamique de polymérisation au bout barbé (Figure 4), et que la concentration d'actine globulaire reste proche de sa valeur initiale A_{G0} dans les premiers instants ($t \cong 0$), la vitesse de polymérisation s'écrit :

$$\mathrm{AP}(0) = \mathrm{NR_0}\ \mathrm{v_0}\ \mathrm{t}$$

Ainsi, une régression quadratique sur la quantité de monomères d'actine consommée permet d'obtenir la vitesse de nucléation NR_0 (Eq. 86, Doolittle et al. 2013).

$$I(t) = At^2 + I_{min}$$

$$\frac{dI}{dt}(t) = 2At = \frac{AP(t)}{SF} \qquad \text{Eq. 86}$$

$$NR_0 = \frac{2\,.\,A\,.\,SF}{k_{on}\,A_{G0} - k_{off}}$$

où k_{on} et k_{off} sont respectivement les constantes cinétiques d'association et de dissociation du monomère d'actine au bout barbé.

La vitesse de polymérisation AP correspond à la dérivée temporelle de la concentration de monomères d'actine sous forme filamenteuse ($AP(t)=d[Actine_F]/dt=-d[Actine_G]/dt$). En supposant que la croissance par les bouts pointus est négligeable, une régression linéaire sur un intervalle situé autour du temps t permet d'estimer la vitesse de polymérisation AP(t) à cet instant ainsi que la concentration de bouts barbés Be(t) (en nM). La caractérisation de ces deux paramètres est généralement effectuée au point où la vitesse de croissance est maximale (Eq. 87, Doolittle et al. 2013).

$$AP(t) = SF \times \frac{dI(t)}{dt}$$

$$Be(t) = \frac{AP(t)}{k_{on}\,A_G(t) - k_{off}} \qquad \text{Eq. 87}$$

où $A_G(t)=A_{G0}-SF\times(I(t)-I_{min})$ représente la concentration en actine globulaire restante à l'instant t.

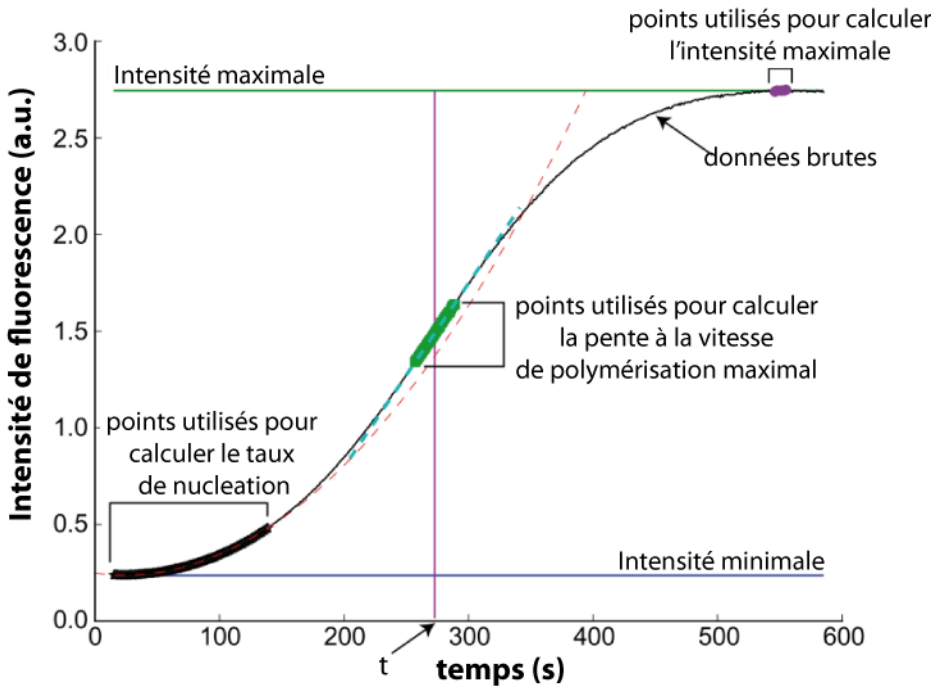


Figure 124 : Représentation graphique de l'analyse de la polymérisation de l'actine-pyrène. (Adapté de Doolittle et al. 2013)

Références Bibliographiques

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson (1994). Molecular Biology of the Cell, 3ème édition.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2008). Molecular Biology of the Cell, 5ème édition.

Altman, D., H. L. Sweeney and J. A. Spudich (2004). "The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring." Cell Press 116: 737-749.

Amann, K. J. and T. Pollard (2000). "Cellular refulation of actin network assembly." Current Biology 10(20): 728-730.

Amann, K. J. and T. D. Pollard (2001). "Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A 98(26): 15009-15013.

Arden, S. D., C. Puri, J. S. Au, J. Kendrick-Jones and F. Buss (2007). "Myosin VI is required for targeted membrane transport during cytokinesis." Mol Biol Cell 18(12): 4750-4761.

Avraham, K. B., T. Hasson, K. P. Steel, D. M. Kingsley, L. B. Russell, M. S. Mooseker, N. G. Copeland and N. A. Jenkins (1995). "The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of the inner ear hair cells." Nature 11: 369-375.

Azioune, A., M. Storch, M. Bornems, M. Théry and M. Piel (2009). "Simple and rapid process for single cell micro-patterning." Lab On Chip 9: 1640-1642.

Baker, J. E., E. B. Krementsova, G. G. Kennedy, A. Armstrong, K. M. Trybus and D. M. Warshaw (2004). "Myosin V processivity: multiple kinetic pathways for head-to-head coordination." Proc Natl Acad Sci U S A 101(15): 5542-5546.

Batchelor, M., M. Wolny, L. Dougan, E. Paci, P. J. Knight and M. Peckham (2015). "Myosin tails and single α-helical domains." Biochemical Society Transactions 43(1): 58-63.

Batters, C., C. P. Arthur, A. Lin, J. Porter, M. A. Geeves, R. A. Milligan, J. E. Molloy and L. M. Coluccio (2004). "Myo1c is designed for the adaptaion response in the inner ear." EMBO 23: 1433-1440.

Batters, C., C. Veigel, E. Homsher and J. R. Sellers (2014). "To understand muscle you must take it apart." Front Physiol 5: 90.

Batters, C., M. I. Wallace, L. M. Coluccio and J. E. Molloy (2004). "A model of stereocilia adaptation based on single molecule mechanical studies of myosin I." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359(1452): 1895-1905.

Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes and J. Plastino (2014). "Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility." Physiol Rev 94(1): 235-263.

Blanchoin, L. and T. Pollard (1999). "Mechanism of Interaction of *Acanthamoeba* Actophorin (ADF/Cofilin) with Actin Filaments." The Journal of Biological Chemistry 274(22): 15538-15546.

Blanchoin, L., T. Pollard and R. D. Mullins (2000). "Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks." Current Biology 10(20): 1273-1282.

Bourdieu, L., M. O. Magnasco, D. A. Winkelmann and A. Libchaber (1995). "Actin filaments on myosin beds: The velocity distribution." Physical Review E 52(6): 6573-6579.

Brangwynne, C. P., G. H. Koenderink, F. C. MacKintosh and D. A. Weitz (2009). "Intracellular transport by active diffusion." Trends Cell Biol 19(9): 423-427.

Brawley, C. M. and R. S. Rock (2009). "Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton." Proc Natl Acad Sci U S A 106(24): 9685-9690.

Bray, D. (2001). Cell Movements ; from molecules to motility, 2nd edition.

Bray, D. and J. G. White (1988). "Cortical Flow in Animal Cells." Science 239(4842): 883-888.

Brokaw, C. J., D. J. L. Luck and B. Huang (1982). "Analysis of the Movement of Chlamydomonas Flagella : The Function of the Radial-spoke System Is Revealed by Comparison of Wild-type and Mutant Flagella." The journal of cell Biology 92: 722-732.

Bruno, L., V. Levi, M. Brunstein and M. A. Desposito (2009). "Transition to superdiffusive behavior in intracellular actin-based transport mediated by molecular motors." Physycal Review 80: 1-8.

Cai, Y., N. Biais, G. Giannone, M. Tanase, G. Jiang, J. M. Hofman, C. H. Wiggins, P. Silberzan, A. Buguin, B. Ladoux and M. P. Sheetz (2006). "Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow." Biophys J 91(10): 3907-3920.

Chaigne, A., C. Campillo, R. Voituriez, N. S. Gov, C. Sykes, M. H. Verlhac and M. E. Terret (2016). "F-actin mechanics control spindle centring in the mouse zygote." Nat Commun 7: 10253.

Chhabra, E. and H. N. Higgs (2007). "The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures." Nature Cell Biology 9(10): 1110-1121.

Clemen, A. E., M. Vilfan, J. Jaud, J. Zhang, M. Barmann and M. Rief (2005). "Force-dependent stepping kinetics of myosin-V." Biophys J 88(6): 4402-4410.

Coluccio, L. M. and L. G. Tilney (1984). "Phalloidin Enhances Actin Assembly by Preventing Monomer Dissociation." The journal of cell Biology 99: 529-535.

Cooper, J., S. Walker and T. Pollard (1983). "Pyrene actin" documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization " Journal of Muscle Research and Cell Motility 4: 253-262.

Coureux, P.-D., A. L. Wells, J. Menetrey, C. M. Yengo, C. A. Morris, H. L. Sweeney and A. Houdusse (2003). "A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide." Nature 425: 419-423.

Crevenna, A. H., N. Naredi-Rainer, A. Schonichen, J. Dzubiella, D. L. Barber, D. C. Lamb and R. Wedlich-Soldner (2013). "Electrostatics control actin filament nucleation and elongation kinetics." J Biol Chem 288(17): 12102-12113.

Dance, A. L., M. Miller, S. Seragaki, P. Aryal, B. White, L. Aschenbrenner and T. Hasson (2004). "Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments." Traffic 5(10): 798-813.

De La Cruz, E. M., H. Lee Sweeney and E. Michael Ostap (2000). "ADP Inhibition of Myosin V ATPase Activity." Biophys J 79: 1524-1529.

De La Cruz, E. M. and E. Michael Ostap (2009). "Kinetic and Equilibrium Analysis of the Myosin ATPase." Methods Enzymol 455: 157-192.

De La Cruz, E. M. and E. M. Ostap (2004). "Relating biochemistry and function in the myosin superfamily." Curr Opin Cell Biol 16(1): 61-67.

De La Cruz, E. M., E. M. Ostap and H. L. Sweeney (2001). "Kinetic mechanism and regulation of myosin VI." J Biol Chem 276(34): 32373-32381.

De La Cruz, E. M., A. L. Wells, S. S. Rosenfeld, E. Michael Ostap and H. Lee Sweeney (1999). "The kinetic mechanism of myosin V." PNAS 96(24): 13726-13731.

Depina, A. and G. M. Langford (1999). "Vesicle Transport: The Role of Actin Filaments and Myosin Motors." Microscopy research and technique 47: 93.

Derivery, E., C. Seum, A. Daeden, S. Loubery, L. Holtzer, F. Julicher and M. Gonzalez-Gaitan (2015). "Polarized endosome dynamics by spindle asymmetry during asymmetric cell division." Nature 528(7581): 280-285.

Doolittle, L. K., M. K. Rosen and S. B. Padrick (2013). "Measurement and analysis of in vitro actin polymerization." Methods Mol Biol 1046: 273-293.

Elbert, D. and J. Hubdell (1998). "Self-assembly and steric stabilization at heterogeneous, biological surfaces using adsorbing block copolymers." Chemistry & Biology 5(3): 177-183.

Ent, F., L. A. Amos and J. Löwe (2001). "Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton." Nature 413: 39-44.

Erlenkamper, C. and K. Kruse (2013). "Treadmilling and length distributions of active polar filaments." J Chem Phys 139(16): 164907.

Fabiato, A. and F. Fabiato (1978). "Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells." Jµ. Gen. Physiol. 72: 667-699.

Fass, J., C. Pak, J. Bamburg and A. Mogilner (2008). "Stochastic simulation of actin dynamics reveals the role of annealing and fragmentation." J Theor Biol 252(1): 173-183.

Fenn, W. O. (1923). "The relation between the work." J. Physiol 58((2-3)): 175-203.

Finer, J. T., R. M. Simmons and J. A. Spudich (1994). "Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps." Nature 368: 113-119.

Gebhardt, J. C., A. E. Clemen, J. Jaud and M. Rief (2006). "Myosin-V is a mechanical ratchet." Proc Natl Acad Sci U S A 103(23): 8680-8685.

Gillespie, O. G. (1977). "Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions." The journal of physical chemistry 81(25): 2340-2361.

Gittes, F., B. Mickey, J. Nettleton and J. Howard (1993). "Flexural Rigidity of Microtubules and Actin Filaments Measured from Thermal Fluctuations in Shape." The journal of cell Biology 120(4): 923-934.

Goldschmidt, P. J., L. M. Machesky, S. K. Doberstein and T. Pollard (1995). "Mechanism of the Interaction of Human Platelet Profilin with Actin " The journal of cell Biology 113(5): 1081-1089.

Goley, E. D. and M. D. Welch (2006). "The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol 7(10): 713-726.

Guerin, T., J. Prost, P. Martin and J. F. Joanny (2010). "Coordination and collective properties of molecular motors: theory." Curr Opin Cell Biol 22(1): 14-20.

Guo, M., A. J. Ehrlicher, M. H. Jensen, M. Renz, J. R. Moore, R. D. Goldman, J. Lippincott-Schwartz, F. C. Mackintosh and D. A. Weitz (2014). "Probing the stochastic, motor-driven properties of the cytoplasm using force spectrum microscopy." Cell 158(4): 822-832.

Gutsche-Perelroizen, I., J. L. Albrecht Ott and M.-F. Carlier (1999). "Filament Assembly from Profilin-Actin." The Journal of Biological Chemistry 274(10): 6234-6243.

Hammer, J. A., 3rd and J. R. Sellers (2012). "Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters." Nat Rev Mol Cell Biol 13(1): 13-26.

Harada, Y., K. KSakurada, T. Aoki, D. Thomas and T. Yanagida (1990). "Mechanochemical Coupling in Actomyosin Energy Transduction Studied by in Vitro Movement Assay " J. Mol. Biol. 216: 49-68.

Hariadi, R. F., M. Cale and S. Sivaramakrishnan (2014). "Myosin lever arm directs collective motion on cellular actin network." Proc Natl Acad Sci U S A 111(11): 4091-4096.

Hodge, T. and J. Cope (2000). "A myosin family tree." CELL SCIENCE AT A GLANCE: 3353-3354.

Howard, J. (2001). Mechanics of Motor Proteins and th Cytoskeleton.

Howard, J. (2009). "Mechanical signaling in networks of motor and cytoskeletal proteins." Annu Rev Biophys 38: 217-234.

Huang, N.-P., R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. Elbert, J. Hubbell and N. D. Spencer (2000). "Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption." Langmuir 17: 489-498.

Inoue, A., J. Saito, R. Ikebe and M. Ikebe (2002). "Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor." Nat Cell Biol 4(4): 302-306.

Insall, R. H. and L. M. Machesky (2009). "Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks." Dev Cell 17(3): 310-322.

Ireton, K. (2013). "Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens." Open Biol 3(7): 130079.

Ishijima, A., H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funastsu and T. Yanagida (1993). "Multiple- and Single-Molecule Analysis of the Actomyosin Motor by Nanometer-Piconewton Manipulation with a Microneedle: Unitary Steps and Forces." Biophysical Journal 70: 383-400.

Ishiwata, S., Y. Shimamoto, M. Suzuki and D. Sasaki (2007). Advances in Experimental Medicine and Biology.

Julicher, F. and J. Prost (1997). "Spontaneous Oscillations of Collective Molecular Motors." Phys. Rev. Lett. 78(23): 4510.

Kabsch, W., H. Georg Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." Nature 347: 37-44.

Kelleher, J. F., S. J. Atkinson and T. Pollard (1995). "Sequences, Structural Models, and Cellular Localization of the Actin-related Proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba " The journal of cell Biology 131(2): 385-397.

Koestler, S. A., K. Rottner, F. Lai, J. Block, M. Vinzenz and J. V. Small (2009). "F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells." PLoS One 4(3): e4810.

Kouyama, T. and K. Mihashi (1981). "Fluorimetry Study of N-(1-Pyreny1)iodoacetamide-Labelled F-Actin " Eur. J. Biochem 114: 33-38.

Krause, M. and A. Gautreau (2014). "Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence." Nat Rev Mol Cell Biol 15(9): 577-590.

Kron, S. J. and J. A. Spudich (1986). "Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface." Biochemistry 83: 6272-6276.

Kuhn, J. R. and T. D. Pollard (2005). "Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy." Biophys J 88(2): 1387-1402.

Laakso, J. M. and E. M. Ostap (2009). "Myosin-I Can Act as a Molecular Force Sensor." Science 321(5885): 133-136.

Lee, S. and R. Dominguez (2010). "Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells." Mol Cells 29(4): 311-325.

Lee, S. and N. D. Spencer (2008). "Adsorption Properties of Poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) at a Hydrophobic Interface: Influence of Tribological Stress, pH, Salt Concentration, and Polymer Molecular Weight." Langmuir 24(9479-9488): 9479.

Lee, S., S. Zurcher, A. Dorcier, G. S. Luengo and N. D. Spencer (2009). "Adsorption and Lubricating Properties of Poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) on Human-Hair Surfaces." Applied Materials & interfaces 1(9): 1938-1945.

Lee, S., S. Zurcher, A. Dorcier, G. S. Luengo and N. D. Spencer (2009). "Adsorption and lubricating properties of poly(l-lysine)-graft-poly(ethylene glycol) on human-hair surfaces." ACS Appl Mater Interfaces 1(9): 1938-1945.

Lehman, W., R. Craig and P. Vibert (1994). "Ca2+-induced tropomyosin movement in *Limulus* thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction." Nature 368: 65-67.

Letort, G., A. Z. Politi, H. Ennomani, M. Thery, F. Nedelec and L. Blanchoin (2015). "Geometrical and mechanical properties control actin filament organization." PLoS Comput Biol 11(5): e1004245.

Lewin, B., L. Cassimeris, V. R. Lingappa and G. Plopper (2007). CELLS, Jones & Bartlett.

Lowey, S., H. S. Slayter, A. G. Weeds and H. Baker (1968). "Subfragments of Myosin Molecule I. Subfragments of myosin by enzymic degradation." J Mol Biol 42: 1-49.

Machesky, L. M., R. D. Mullins, H. N. Higgs, D. A. Kaiser, L. Blanchoin, R. C. May, M. E. Hall and T. Pollard (1999). "Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2 y 3 complex." Cell Biology 96: 3739-3744.

Machin, K. E. (1958). "wave propagation along flagella." Journal of experimental biology: 796-806.

Maddugoda, M. P., M. S. Crampton, A. M. Shewan and A. S. Yap (2007). "Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells." J Cell Biol 178(3): 529-540.

Marchand, J.-B., D. A. Kaiser, T. Pollard and H. N. Higgs (2000). "Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex." Nature Cell Biology 3: 76-83.

Margossian, S. S. and S. Lowey (1982). "Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle." Methods in Enzymology 85: 55-71.

Marks, F., U. KlingmUller and K. Müller-Decker (2008). Cellular Signal Processing: An Introduction to the Molecular Mechanisms of Signal Transduction, Garland Science.

Martin, A. C., M. D. Welch and D. G. Drubin (2006). "Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation." Nat Cell Biol 8(8): 826-833.

Mattila, P. K. and P. Lappalainen (2008). "Filopodia: molecular architecture and cellular functions." Nat Rev Mol Cell Biol 9(6): 446-454.

McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, H.-G. Mannherz and A. G. Weeds (1993). "Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing." Nature 364: 685-692.

Mehta, A. D., R. S. Rock, M. Rief, J. A. Spudich, M. S. Mooseker and R. E. Cheney (1999). "Myosin-V is a processive actin-based motor." Nature 4000: 590-593.

Menetrey, J., P. Llinas, M. Mukherjea, H. L. Sweeney and A. Houdusse (2007). "The structural basis for the large powerstroke of myosin VI." Cell 131(2): 300-308.

Michalski, N., V. Michel, A. Bahloul, G. Lefevre, J. Barral, H. Yagi, S. Chardenoux, D. Weil, P. Martin, J. P. Hardelin, M. Sato and C. Petit (2007). "Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning." J Neurosci 27(24): 6478-6488.

Milligan, R. A., M. Whittaker and D. Safer (1990). "Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites." Nature 348: 217-221.

Molloy, J. E., J. E. NBurns, J. Kendrick-jones, R. T. Tregear and D. C. S. White (1995). "Movement and force produced by a single myosin head." Nature 378: 209-212.

Morris, C. A., A. L. Wells, Z. Yang, L. Q. Chen, C. V. Baldacchino and H. L. Sweeney (2003). "Calcium functionally uncouples the heads of myosin VI." J Biol Chem 278(26): 23324-23330.

Muller, M. J., S. Klumpp and R. Lipowsky (2010). "Bidirectional transport by molecular motors: enhanced processivity and response to external forces." Biophys J 98(11): 2610-2618.

Mullins, R. D., J. A. Heuser and T. Pollard (1998). "The interaction of Arp2 y 3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." Cell Biology 95: 6181-6186.

Nagy, A., Y. Takagi, N. Billington, S. A. Sun, D. K. Hong, E. Homsher, A. Wang and J. R. Sellers (2013). "Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIb at the single molecule level." J Biol Chem 288(1): 709-722.

Nishikawa, M., S. Nishikawa, A. Inoue, A. H. Iwane, T. Yanagida and M. Ikebe (2006). "A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX." Biochem Biophys Res Commun 343(4): 1159-1164.

Oda, T., K. Namba and Y. Maeda (2005). "Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis." Biophys J 88(4): 2727-2736.

Okten, Z., L. S. Churchman, R. S. Rock and J. A. Spudich (2004). "Myosin VI walks hand-over-hand along actin." Nat Struct Mol Biol 11(9): 884-887.

Olivares, A. O., W. Chang, M. S. Mooseker, D. D. Hackney and E. M. De La Cruz (2006). "The tail domain of myosin Va modulates actin binding to one head." J Biol Chem 281(42): 31326-31336.

Pecreaux, J., J. C. Roper, K. Kruse, F. Julicher, A. A. Hyman, S. W. Grill and J. Howard (2006). "Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators." Curr Biol 16(21): 2111-2122.

Perelroizen, I., M.-F. Carlier and D. Pantaloni (1994). "Binding of Divalent Cation and Nucleatide to G-actin in the Presence of Profilin." The Journal of Biological Chemistry 270(4): 1501-1508.

Pernier, J., S. Shekhar, A. Jegou, B. Guichard and M. F. Carlier (2016). "Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility." Dev Cell 36(2): 201-214.

Pierobon, P., S. Achouri, S. Courty, A. R. Dunn, J. A. Spudich, M. Dahan and G. Cappello (2009). "Velocity, processivity, and individual steps of single myosin V molecules in live cells." Biophys J 96(10): 4268-4275.

Plaçais, P. Y. (2008). Propriétés mécaniques de la myosine II in vitro : de la molécule unique aux effets collectifs Bio-Physique, Paris 6.

Placais, P. Y., M. Balland, T. Guerin, J. F. Joanny and P. Martin (2009). "Spontaneous oscillations of a minimal actomyosin system under elastic loading." Phys Rev Lett 103(15): 158102.

Pollard, T., L. Blanchoin and R. D. Mullins (2000). "Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells." Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29: 545-576.

Pollard, T. and G. G. Borisy (2003). "Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments." Cell 112: 453-465.

Pollard, T. and J. Cooper (1984). "Quantitative Analysis of the Effect of Acanthamoeba Profilin on Actin Filament Nucleation and Elongation." Biochemistry 23: 6631-6641.

Preller, M. and D. J. Manstein (2013). "Myosin structure, allostery, and mechano-chemistry." Structure 21(11): 1911-1922.

Pringle, J. W. S. (1978). "The Croonian Lecture, 1977 : Stretch Activation of Muscle: Function and Mechanism." Proc. R. Soc. Lond. B 201: 107-130.

Reymann, A. C., R. Boujemaa-Paterski, J. L. Martiel, C. Guerin, W. Cao, H. F. Chin, E. M. De La Cruz, M. Thery and L. Blanchoin (2012). "Actin network architecture can determine myosin motor activity." Science 336(6086): 1310-1314.

Reymann, A. C., J. L. Martiel, T. Cambier, L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski and M. Thery (2010). "Nucleation geometry governs ordered actin networks structures." Nat Mater 9(10): 827-832.

Riedel-Kruse, I. H., A. Hilfinger, J. Howard and F. Julicher (2007). "How molecular motors shape the flagellar beat." HFSP J 1(3): 192-208.

Rief, M., R. S. Rock, A. D. Mehta, M. S. Mooseker, R. E. Cheney and J. A. Spudich (2000). "Myosin-V stepping kinetics: A molecular model for processivity." PNAS 97(17): 9482-9486.

Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. A. Kaiser, J.-B. Marchand, H. N. Higgs, S. Choe and T. Pollard (2001). "Crystal Structure of Arp2/3 Complex." Science 294: 1679-1684.

Rock, R. S., S. E. Rice, A. L. Wells, T. J. Purcell, J. A. Spudich and H. L. Sweeney (2001). "Myosin VI is a processive motor with a large step size." Proc Natl Acad Sci U S A 98(24): 13655-13659.

Rock, R. S., M. Rief, A. D. Mehta and J. A. Spudich (2000). "In vitro assays of processive myosin motors." Methods 22(4): 373-381.

Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa and M. W. Krischner (1999). "The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly." Cell 97: 221-231.

Rouiller, I., X. P. Xu, K. J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T. D. Pollard, N. Volkmann and D. Hanein (2008). "The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex." J Cell Biol 180(5): 887-895.

Ruff, C., M. Furch, B. Brenner, D. J. Manstein and E. Meyhöfer (2001). "Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains." Nature 8(3): 226-229.

Sakamoto, T., F. Wang, S. Schmitz, Y. Xu, Q. Xu, J. E. Molloy, C. Veigel and J. R. Sellers (2003). "Neck length and processivity of myosin V." J Biol Chem 278(31): 29201-29207.

Salbreux, G., J. F. Joanny, J. Prost and P. Pullarkat (2007). "Shape oscillations of non-adhering fibroblast cells." Phys Biol 4(4): 268-284.

Salmon, W. C., M. C. Adams and C. M. Waterman-Storer (2002). "Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells." J Cell Biol 158(1): 31-37.

Sanchez, T., D. Welch, D. Nicastro and Z. Dogic (2011). "Cilia-Like Beating of Active Microtubule Bundles." Science 333: 456-459.

Schafer, D. A., P. B. Jennings and J. A. Cooper (1996). "Dynamics of Capping Protein and Actin Assembly In Vitro: Uncapping Barbed Ends by Polyphosphoinositides " The journal of cell Biology 135(1): 169-179.

Schlapak, R., D. Armitage, N. Saucedo-Zeni, W. Chrzanowski, M. Hohage, D. Caruana and S. Howorka (2009). "Selective protein and DNA adsorption on PLL-PEG films modulated by ionic strength." Soft Matter 5(3): 613-621.

Schmoller, K. M., T. Niedermayer, C. Zensen, C. Wurm and A. R. Bausch (2011). "Fragmentation is crucial for the steady-state dynamics of actin filaments." Biophys J 101(4): 803-808.

Schnitzer, M. J. and S. M. Block (2000). "Force production by single kinesin motors." Nature Cell Biology 2: 718-723.

Schutt, C. E., J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. C. W. Goonesekere and U. Lindberg (1993). "The structure of crystalline profilin-B-actin." Nature 365: 810-816.

Schutt, C. E., J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. C. W. Goonesekere and U. Lindberg (1993). "The structure of crystalline profiline-β-actin." Nature 365: 810-816.

Sept, D., J. Q. Wu, T. D. Pollard and J. A. McCammon (1999). "Annealing Accounts for the Length of Actin Filaments Formed by Spontaneous Polymerization." Biophysical Journal 77: 2911-2919.

Sivaramakrishnan, S. and J. A. Spudich (2009). "Coupled myosin VI motors facilitate unidirectional movement on an F-actin network." J Cell Biol 187(1): 53-60.

Spudich, J. A. and S. Sivaramakrishnan (2010). "Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis." Nat Rev Mol Cell Biol 11(2): 128-137.

Svoboda, K. and S. M. Block (1994). "Force and velocity measured for single kinesin molecules." Cell 77: 773-784.

Szent-Gyorgyi, A. G. (2004). "The early history of the biochemistry of muscle contraction." J Gen Physiol 123(6): 631-641.

Takagi, Y., E. E. Homsher, Y. E. Goldman and H. Shuman (2006). "Force generation in single conventional actomyosin complexes under high dynamic load." Biophys J 90(4): 1295-1307.

Theriot, J. A. and T. J. Mitchison (1991). "Actin microfilament dynamucs in locomoting cells." Nature 352: 126-131.

Tojkander, S., G. Gateva and P. Lappalainen (2012). "Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles." J Cell Sci 125(Pt 8): 1855-1864.

Uemura, S., H. Higuchi, A. O. Olivares, E. M. De La Cruz and S. Ishiwata (2004). "Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor." Nat Struct Mol Biol 11(9): 877-883.

Valentine, M. T., Z. E. Perlman, M. L. Gardel, J. H. Shin, P. Matsudaira, T. J. Mitchison and D. A. Weitz (2004). "Colloid surface chemistry critically affects multiple particle tracking measurements of biomaterials." Biophys J 86(6): 4004-4014.

Veigel, C., J. E. Molloy, S. Schmitz and J. Kendrick-Jones (2003). "Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers." Nat Cell Biol 5(11): 980-986.

Veigel, C., S. Schmitz, F. Wang and J. R. Sellers (2005). "Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity." Nat Cell Biol 7(9): 861-869.

Veigel, C., F. Wang, M. L. Bartoo, J. R. Sellers and J. E. Molloy (2002). "The gated gait of the processive molecular motor, myosin V." Nat Cell Biol 4(1): 59-65.

Vilfan, A. (2001). "The Binding Dynamics of Tropomyosin on Actin." Biophysical Journal 81: 3146-3155.

Wan, K. Y., K. C. Leptos and R. E. Goldstein (2014). "Lag, lock, sync, slip: the many 'phases' of coupled flagella." J R Soc Interface 11(94): 20131160.

Wang, F., R. V. Sampogna and B. R. Ware (1989). "pH Dependence of actin self-assembly." Biophysical Journal 55: 293-298.

Wang, Y. (1985). "Exchange of Actin Subunits at the Leading Edge of Living Fibroblasts: Possible Role of Treadmilling " The journal of cell Biology 101: 597-602.

Watanabe, N. and T. J. Mitchison (2002). "Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia." Science 295(5557): 1083-1086.

Weston, L., A. S. Coutts and N. B. La Thangue (2012). "Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme." J Cell Sci 125(Pt 15): 3519-3527.

Yildiz, A., J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman and P. R. Selvin (2003). "Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization." Science 300(5628): 2061-2065.

Zimmerle, C. T. and C. Frieden (1986). "Effect of Temperature on the Mechanism of Actin Polymerization." Biochemistry 25(21): 6432-6438.

Zimmerle, C. T. and C. Frieden (1988). "Effect of pH on the Mechanism of Actin Polymerization." Biochemistry 27(20): 7766-7772.

Zimmermann, D., A. Santos, D. R. Kovar and R. S. Rock (2015). "Actin age orchestrates myosin-5 and myosin-6 run lengths." Curr Biol 25(15): 2057-2062.

Résumé :

Les moteurs moléculaires permettent le transport actif de molécules et d'organelles le long de filaments polaires du cytosquelette de la cellule eucaryote. Les filaments peuvent s'organiser en réseaux parallèles, antiparallèles, ou désordonnés. Malgré son importance, l'influence de l'architecture du cytosquelette sur le transport de cargos par des moteurs moléculaires est souvent ignorée. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé des patrons surfaciques de nucléation pour contrôler la géométrie de polymérisation de filaments d'actine. Cette approche permet de reproduire *in vitro* les trois types de réseaux qui sont observés *in vivo*. En adsorbant des moteurs moléculaires purifiés à la surface de nanobilles fluorescentes (diamètre 200 nm), nous avons étudié le transport de ces cargos dans des réseaux antiparallèles émergeant de deux lignes de nucléation parallèles. Nous avons observé que les billes recouvertes de moteurs processifs HMM-V (Heavy Mero-Myosine V) génèrent des mouvements dirigés en direction du milieu du réseau où la polarité moyenne des filaments est nulle et où les billes s'accumulent. De plus, la distribution de positions des billes à l'état stationnaire peut être déduite des profils de vitesse et de diffusion des billes, indiquant que le transport actif suit un processus de convection-diffusion. Les billes recouvertes de moteurs non-processifs HMM-II (Heavy Mero-Myosine II) démontrent des comportements similaires. Cependant, bien que le gradient de vitesse des billes HMM-II soit plus important que pour les billes HMM-V au centre du réseau, le coefficient de diffusion l'est bien davantage. Le centrage de ces billes est ainsi moins précis qu'avec la HMM-V. A notre surprise, nous avons observé que la précision du centrage ne dépend pas de l'espacement entre les deux lignes de nucléation, donc de la taille du système. Le comportement des billes est décrit par un modèle à trois états dans lequel la bille sonde localement la polarité nette du réseau en se détachant et en se rattachant fréquemment aux filaments. Une séquence stochastique de déplacements dirigés dans un état attaché aux filaments et d'explorations diffusives dans un état détaché, conduit à une marche aléatoire biaisée avec un coefficient de diffusion et une vitesse effectifs. Notre description physique indique que la précision du positionnement des billes dépend du gradient de polarité nette du réseau de filaments ainsi que de la distance moyenne de parcours des billes dans l'état attaché à l'actine. Nos résultats démontrent ainsi le rôle clef que joue l'architecture du réseau de filaments sur les propriétés du transport.

Dans la cellule, les moteurs moléculaires permettent également la réorganisation des filaments du cytosquelette. En ajoutant nos moteurs moléculaires en solution, nous avons observé qu'un réseau de filaments d'actine parallèles, polymérisés *in vitro* à partir d'une ligne ou d'un disque de nucléation, peut former spontanément des faisceaux oscillants. Ces oscillations ressemblent aux battements du flagelle du spermatozoïde. En particulier, le système génère des ondes de déformation transverses se propageant de la base à l'apex du faisceau oscillant à une vitesse de 0,5 µm/s. Au cours du temps, les faisceaux d'actine s'épaississent, ce qui conduit à un ralentissement de l'oscillation avec une période qui croît de 25 s à 40 s. De plus, nous avons observé que des faisceaux d'actine voisins sont capables de se synchroniser, comme c'est le cas entre les deux flagelles de l'algue Chlamydomonas. Notre système acto-myosine minimal permet donc d'imiter le battement de flagelles, bien que la nature des moteurs moléculaires et des filaments en jeu soit complètement différente. Ainsi, ce système fournit un nouvel outil pour étudier les propriétés physiques génériques du battement flagellaire.