



HAL
open science

Les billes magnétiques comme capteurs de force : application à la pression de croissance de filaments d'actine

Damien Démoulin

► **To cite this version:**

Damien Démoulin. Les billes magnétiques comme capteurs de force : application à la pression de croissance de filaments d'actine. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : . pastel-00733095

HAL Id: pastel-00733095

<https://pastel.hal.science/pastel-00733095>

Submitted on 17 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre

Présentée par

Damien DÉMOULIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Les billes magnétiques comme capteurs de force : application
à la pression de croissance de filaments d'actine**

Soutenue publiquement le 10 mai 2012 devant le jury composé de :

M. Jean-François JOANNY	Président
M. Laurent BLANCHOIN	Rapporteur
M. Philippe POULIN	Rapporteur
Mme Marie-France CARLIER	Examinatrice
M. Vincent CROQUETTE	Examineur
M. Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M. Jean BAUDRY	Co-Directeur de thèse

Remerciements

C'est avec une pointe de nostalgie que je me souviens des premières discussions avec Jérôme Bibette et Jean Baudry sur la thèse que je pourrais effectuer au LCMD. Vous m'avez tout de suite fait sentir l'atmosphère si particulière de ce laboratoire où la science, tant fondamentale qu'appliquée, se doit avant tout d'être enthousiasmante. Bientôt quatre ans après, je suis en mesure de dire que l'alchimie de ce labo a bien réussi sur moi et il est temps de remercier tous ceux qui ont contribué à ce qu'elle réussisse.

Mes premiers remerciements vont évidemment à Jérôme et Jean. Merci Jérôme de m'avoir accueilli dans ton équipe, merci pour la confiance que tu m'as témoignée et l'autonomie que tu m'as laissée. Ton dynamisme et tes conseils souvent visionnaires m'ont guidé tout au long de ma thèse. Jean, travailler avec toi a été un véritable privilège. Merci pour ton incroyable disponibilité et ton soutien de tous les jours. Le terme d'apprentissage par la recherche prend tout son sens avec toi car tu sais transmettre avec patience ta rigueur scientifique, ton enthousiasme et ta passion pour la science. J'ai énormément mûri à tes côtés.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble de mon jury de thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail : Jean-François Joanny qui m'a fait l'honneur de le présider, Laurent Blanchoin et Philippe Poulin qui ont accepté la tâche de rapporteur, Marie-France Carlier et Vincent Croquette qui m'ont apporté leur point de vue pertinent.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le support de l'équipe de Marie-France Carlier au Laboratoire d'Enzymologie et de Biologie Structurale de Gif-sur-Yvette. Je tiens donc à remercier

chaleureusement Marie-France pour la réussite de la collaboration entre nos deux labos d'horizons différents, mais aussi pour la gentillesse avec laquelle elle a comblé mes lacunes de néophyte en biologie. Un grand merci à Guillaume Romet-Lemonne et Antoine Jégou pour toutes les petites discussions que nous avons eues lors de ces fameux ravitaillements en actine, dans l'atmosphère blafarde d'un quai de RER à la nuit tombée... Merci également à Dominique Didry qui préparait l'actine que je consommais avidement et à Lionel Chieze : ça marchera un jour avec ces formines.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble de l'"équipe actine" du laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes à l'ESPCI et plus particulièrement Olivia du Roure. Merci d'avoir accompagné mes premières manip avec l'actine, et d'avoir toujours été là pour prodiguer conseils et encouragements avec le sourire, même dans les moments difficiles où "y a rien qui pousse".

L'apport de Mike Cates a été déterminant pour certains aspects théoriques de ce travail. Je lui en suis très reconnaissant.

Cette thèse est le fruit d'un travail de longue haleine qui s'est nourri de discussions passionnantes avec de nombreuses personnes que je souhaite remercier pour les idées brillantes qu'elles m'ont apportées : Paul Chaikin, Rémi Dreyfus, David Lacoste, David Pine, David Weitz, et Philippe Poulin que je remercie particulièrement pour cet échange enrichissant que nous avons eu à propos de mon manuscrit de thèse.

Merci aux stagiaires qui sont venus se frotter avec moi aux dures réalités de la science : Adrien Hallou, Géraldine Lam, Alexis Mazurier, Vincent Miralles, Thibaut Thupnot, Simon Tusch.

Et puis il y a toute l'équipe du LCMD. Travailler à vos côtés pendant ces années a été aussi plaisant qu'enrichissant.

Je commence par les "cadres" qui tiennent la maison. Nicolas, tes conseils à des moments décisifs de ma thèse ont été précieux. Lise, jongler entre les demandes d'achat et les contrats paraît si simple grâce à toi. Laurent, merci pour tes conseils techniques. Jean-Yves, tous ces services que tu n'hésites jamais à rendre, toujours dans la bonne humeur, font la vie au labo plus facile. Florence, merci pour tout le soin que tu prends à t'assurer que chacun travaille dans les meilleures conditions. Tu es notre maman du labo !

Il y a aussi mes aînés, qui volent maintenant vers d'autres horizons. J'ai une pensée toute particulière pour Coraline, dont j'ai repris le flambeau... avec un peu de décalage. Mais il y a aussi Matthijs, qui a guidé mes premiers pas au labo, Djamal, qui a aussi accompagné mes débuts à sa façon, Julie G., Larysa, Enric, Fabien, Jean-Daniel et Rachid.

Il y a ceux qui m'ont accompagné depuis (presque) le début : merci à Donatien pour les manip de dernière minute et pour tous ces gâteaux qu'on a mangés grâce à toi, à Denis pour tes conseils avisés en Illustrator et ton entrain à débattre de toute question scientifique, à Leslie ma coach personnelle en graphisme et design, à Nico qui a assuré pour le film de mobilité cellulaire la veille de la soutenance.

Il y a mes cadets, que j'ai vu débiter au labo : Fanny, Julie B., Perrine, Hugo, Kévin, Rory ; et les nouveaux anciens, Céline, Gabrielle, Shima, Jairo, Wang. Nous n'avons fait qu'un petit bout de chemin ensemble mais votre présence pendant mes longues journées de rédaction a été très réconfortante.

La réussite de ce travail tient aussi au soutien de tous les amis. Alors merci à mes camarades thésards de l'école, Mymy, Aurélie, Max, pour tous les coups de main et les soirées TB à refaire la science. Et bien sûr merci à la tribu PC12, aux Mâconnais, pour tous les bons moments passés ensemble et tous les autres à venir.

Et enfin, merci à mes parents de me soutenir infailliblement depuis que je me suis embarqué "dans ces longues études". Merci à toute ma famille, vous voir tous présents le jour de la soutenance m'a fait chaud au coeur.



Table des matières

I	Propriétés magnétiques : du microscopique au mésoscopique	15
1	Propriétés des grains superparamagnétiques	19
1.1	Synthèse	19
1.2	Propriétés magnétiques d'un ferrofluide	20
1.3	L'anisotropie magnétique	21
1.4	Couplage entre un grain et son moment magnétique	23
1.5	Comportement des grains sous champ à l'équilibre	24
1.5.1	Évolution de l'aimantation avec le champ externe	24
1.5.2	Évolution de l'orientation des grains avec le champ externe	26
1.5.2.1	Biréfringence d'un ferrofluide	26
1.5.2.2	Évolution de la biréfringence avec le champ	27
1.6	Dynamique de l'orientation des grains	28
1.6.1	Effet des fluctuations thermiques	28
1.6.2	Couplage de l'orientation du grain et de son moment	29
1.6.3	Conclusion	31
1.7	Caractérisation expérimentale du ferrofluide	32
1.7.1	Caractéristiques physiques du ferrofluide	32
1.7.2	Dispositif expérimental	33
1.7.3	Étalonnage du montage	34
1.7.4	Évolution de la biréfringence du ferrofluide avec le champ	35

1.7.5	Récapitulatif des caractéristiques du ferrofluide	36
2	Étude expérimentale du couplage entre bille et champ magnétique	39
2.1	Description des billes utilisées	40
2.1.1	Nature et fabrication	40
2.1.2	Nombre de grains dans les billes	41
2.2	Les billes sont optiquement anisotropes	42
2.2.1	Principe de la DDLS	42
2.2.2	Réalisation pratique	44
2.3	Système expérimental	46
2.3.1	Instrumentation	47
2.3.2	Calcul de l'intensité lumineuse mesurée	48
2.3.3	Précautions pour mesurer le comportement des billes isolées	49
2.4	Comportement des billes isolées à l'équilibre sous champ	52
2.5	Évolution avec le nombre de grains	56
2.6	Dynamique des billes	58
2.6.1	Normalisation par la viscosité	58
2.6.2	Coupure du champ	59
2.6.3	Établissement du champ	61
2.7	Comparaison avec la littérature	63
Annexe A	Synthèse de billes magnétiques	67
Annexe B	Anisotropie optique d'une suspension de billes magnétiques	69
II	Pression de croissance de filaments d'actine	79
3	Forces générées dans les systèmes biologiques : présentation et modélisation	83
3.1	Introduction	83
3.2	Mécanique du cytosquelette	84
3.2.1	Nature du cytosquelette	84
3.2.2	Propriétés générales du cytosquelette	85
3.2.3	Structures à base de microtubules	87
3.2.4	Structures à base de filaments d'actine	88
3.2.5	Structures à base de filaments intermédiaires	89

3.2.6	Conclusion	90
3.3	Forces générées par les microtubules	90
3.3.1	La ségrégation des chromosomes	90
3.3.2	Mesure de force générée par la polymérisation de microtubules	91
3.4	La migration cellulaire	92
3.4.1	Mécanisme	92
3.4.2	Mesure de force sur cellule entière	93
3.5	La propulsion intracellulaire de pathogènes	94
3.5.1	Description	94
3.5.2	Mesures de force sur des comètes d'actine	95
3.5.3	Mesures de force sur gels d'actine	97
3.5.4	Mesures de force sur filament unique	100
3.6	Biochimie de l'actine	101
3.6.1	Les filaments d'actine sont polarisés	101
3.6.2	Les protéines régulatrices	102
3.7	Comment la polymérisation génère-t-elle une force ?	104
3.7.1	Bilan thermodynamique hors équilibre	104
3.7.2	Aspects cinétiques	107
3.8	Modèles mécanistiques	108
3.8.1	Le modèle du <i>Brownian ratchet</i>	108
3.8.2	Le modèle du <i>Brownian ratchet</i> élastique	109
3.8.3	Le modèle entropique	111
3.8.4	Passage à N filaments	113
3.9	Généralisation à des géométries complexes	114
3.9.1	Simulations numériques	114
3.9.2	Modèles mésoscopiques	116
3.10	Vérification expérimentale des modèles	116
3.10.1	Test du <i>Brownian ratchet</i> sur les comètes	116
3.10.2	Mesures de forces sur une assemblée de filaments	117
3.11	Conclusion	117
4	Mesure de force dans une géométrie contrôlée	119
4.1	Introduction	119

TABLE DES MATIÈRES

4.2	Conditions expérimentales	120
4.2.1	Protéines	120
4.2.2	Greffage de la gelsoline sur les billes magnétiques	120
4.2.3	Conditions biochimiques	122
4.3	Mesure de force et de distance	124
4.3.1	La machine de force	124
4.3.2	Suivi cinétique	126
4.3.3	Mesures mécaniques	126
4.4	Modification du dispositif expérimental	127
4.4.1	Choix des billes	127
4.4.2	Marquage fluorescent	128
4.4.3	Nouveau protocole expérimental	128
4.5	Évaluation de l'erreur de mesure	129
4.6	Caractérisation des billes	131
4.6.1	Taille	131
4.6.2	Propriétés de surface	132
4.6.3	Densité de gelsoline greffée	132
4.6.3.1	Spectroscopie de fluorescence	132
4.6.3.2	Cytométrie en flux	133
4.6.3.3	Microscopie confocale	133
4.7	Conclusion	136
5	Mécanismes de génération de force par les filaments d'actine	137
5.1	Introduction	137
5.2	Génération de force par des filaments très fluctuants	138
5.2.1	Détails du modèle entropique	139
5.2.2	Validation du modèle	141
5.2.3	Conclusion	143
5.3	De la maîtrise de l'amplitude des fluctuations	144
5.3.1	La fascine	144
5.3.2	Modification de l'organisation des filaments par la fascine	146
5.3.2.1	Visualisation au microscope confocal	146
5.3.2.2	Aspect énergétique	147

5.3.3	Augmentation de la rigidité par la fascine	149
5.3.3.1	Cas sans fascine	149
5.3.3.2	Cas avec fascine	150
5.3.4	Séquence de forces différentes	152
5.3.5	Efficacité de la génération de force	154
5.4	Mécanisme de génération de force	156
5.4.1	Description par le modèle entropique	156
5.4.2	Description naïve par le <i>Brownian ratchet</i>	156
5.4.3	Description par le <i>Brownian ratchet</i> sans partage de la charge	157
5.4.3.1	Présentation	157
5.4.3.2	Longueur des filaments	158
5.4.3.3	Profil vitesse - force	159
5.4.3.4	Nombre de filaments proches de la charge	160
5.4.3.5	Application d'une séquence de force	162
5.4.4	Conclusion	163
Annexe C Influence de la diffusion dans le système expérimental		167
Annexe D Simulation numérique du <i>Brownian ratchet</i>		169
6	Conclusion générale	179

Introduction générale

Ce travail de thèse s'articule autour d'un matériau complexe : les colloïdes superparamagnétiques, que nous appellerons plus simplement billes magnétiques dans la suite.

La première partie de ce mémoire part du constat que même si les billes magnétiques sont utilisées dans de nombreuses études pour appliquer une force magnétique à des systèmes biologiques, le processus physique par lequel cette force est générée reste mal connu. On décrit généralement chaque bille comme un dipôle induit qui acquiert une aimantation dans un champ magnétique externe. Cette représentation est appropriée dans de nombreuses situations mais ne peut pas expliquer comment on peut appliquer un couple à ces objets dans les expériences de pinces magnétiques. Pour comprendre ce phénomène, nous commençons par analyser les propriétés magnétiques des grains d'oxyde de fer de taille nanométrique qui composent les billes. Une méthode basée sur les propriétés d'anisotropie optique des billes nous permet d'une part de montrer qu'elles s'orientent dans un champ magnétique externe, et d'autre part d'étudier la façon dont elles s'orientent. Cette expérience permettra d'élaborer un modèle expliquant comment le couplage de chaque grain avec le champ externe peut expliquer le couplage global de la bille.

Dans une seconde partie les colloïdes superparamagnétiques sont utilisés pour exercer des forces sur une population de filaments d'actine. Ces filaments sont les acteurs majeurs du phénomène de motilité cellulaire. Le réseau de filaments est une structure dynamique qui, en se remodelant constamment, exerce une pression continue sur la membrane cellulaire et la fait avancer. Ce réseau est de plus soumis aux fluctuations thermiques, très importantes à cette échelle de la matière. Notre système expérimental regroupe toutes ces contraintes dans une géométrie modèle qui permet de sonder le mécanisme physique de génération de force par la seule polymérisation de l'actine. En jouant sur l'organisation des filaments,

deux cas limite sont obtenus, qui correspondent chacun à une situation idéale envisagée par un modèle théorique de génération de force différent. Nous démontrerons que le premier cas limite, où les filaments sont libres de s'orienter et par conséquent les fluctuations sont très grandes, correspond au modèle entropique. La seconde situation idéale est obtenue en forçant les grains à s'assembler en faisceaux très rigides. Cette nouvelle organisation sera caractérisée en détails expérimentalement. Un modèle de type *Brownian ratchet* élaboré à partir de simulations numériques permettra de comprendre la force générée dans ces conditions.

Première partie

Propriétés magnétiques : du microscopique au mésoscopique

Introduction

L'intérêt majeur des colloïdes superparamagnétiques, appelées communément billes magnétiques, consiste en l'apparition d'une forte aimantation à l'application d'un champ magnétique, qui disparaît instantanément dès que le champ est coupé. Leur petite taille (typiquement $1\ \mu\text{m}$) ainsi que le fait de pouvoir les manipuler à distance à l'aide d'un aimant puis de les redisperser instantanément les rend très intéressants pour la biochimie, où le nombre d'applications est sans cesse croissant. En effet, leur surface peut être fonctionnalisée, ce qui en fait une alternative plus simple et plus douce à la chromatographie pour la séparation de biomolécules ou de cellules, à partir d'un milieu complexe. Elles servent également de matériau de base à des tests immunologiques de grande sensibilité [Liabakk et al., 1990]. Mais ces particules ont également un intérêt pour des applications plus fondamentales. Elles permettent par exemple de modéliser le comportement d'atomes dont l'énergie d'interaction peut facilement être variée en changeant la force du champ magnétique appliqué et ainsi d'analyser les phénomènes de transition de phase [Zahn et al., 1999]. Elles ont aussi été utilisées pour modéliser les phénomènes de nage des microorganismes à bas nombre de Reynolds [Dreyfus et al., 2005]. On trouve depuis les années 1990 des billes très magnétiques et très monodisperses dans le commerce auprès d'entreprises telles que Ademtech ou Dynal (qui fait maintenant partie du groupe Life Technologies).

Les billes sont constituées de plusieurs centaines à plusieurs milliers de grains d'oxyde de fer magnétiques de taille nanométrique. Par analogie avec le paramagnétisme, on considère classiquement ces billes comme des dipôles magnétiques induits. Les moments magnétiques de chaque grain sont désordonnés à champ extérieur nul, ce qui résulte en une aimantation globale nulle pour la bille. Dès qu'un champ extérieur est appliqué, le moment de chaque grain s'oriente parallèlement au champ et la bille devient magnétique. Enfin, dès que le champ est coupé, les moments des grains se désordonnent et

la bille retrouve son état non magnétique. On décrit donc les billes par leur susceptibilité magnétique χ qui lie leur aimantation volumique induite M au champ appliqué B par la relation

$$M(B) = \chi(B) \frac{B}{\mu_0} \quad (1)$$

où μ_0 est la perméabilité du vide. La forme exacte de $M(B)$ est mesurée empiriquement. Son allure typique est représentée FIGURE 1.

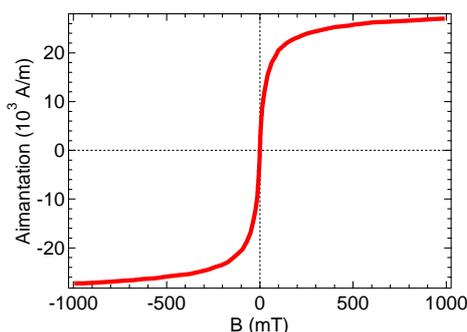


FIGURE 1 – Courbe d’aimantation de billes Dynal MyOne de diamètre 1 μm mesurée par VSM (*Vibrating Sample Magnetometer*). Données fournies par Dynal.

Cette description simplifiée s’avère juste dans certains cas limites. On la reprendra d’ailleurs pour calculer la force magnétique appliquée par une bille sur des filaments d’actine. Mais elle ignore le mécanisme exact par lequel les billes s’aimantent. Ainsi, nombre d’expérimentateurs ont constaté l’existence d’un couplage entre les billes et le champ qu’on leur applique, ce qui va à l’encontre de la description macroscopique isotrope du dipôle induit. C’est le cas dans les expériences réalisées avec des pinces magnétiques [Gosse and Croquette, 2002]. Ainsi, une bille peut être mise en rotation dans un champ magnétique tournant pour appliquer un couple de torsion sur des molécules d’ADN [Strick et al., 1996], ce qui permet de tester leur résistance. Cette technique a été appliquée à la mesure de la résistance en torsion de liens antigène-anticorps [Janssen et al., 2011] et même de cellules [Hu et al., 2004].

On se propose dans cette partie de percer l’origine de ce couplage. Pour cela on commencera par une étude approfondie du comportement des grains d’oxyde de fer en suspension dans un liquide et donc libres de bouger. La compréhension du couplage entre ces grains et leur moment magnétique nous mènera naturellement à expliciter le couplage entre les billes et un champ magnétique appliqué.

CHAPITRE 1

Propriétés des grains superparamagnétiques

Les grains que contiennent les billes magnétiques sont des particules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Une suspension de ces grains dans un liquide est appelée ferrofluide. C'est cette suspension dont nous allons détailler les propriétés.

1.1 Synthèse

Le ferrofluide servant de base à la fabrication des billes que nous utilisons est fabriqué selon le protocole Massart [Massart, 1981] : des ions $\text{Fe}[\text{II}]$ et $\text{Fe}[\text{III}]$ en solution aqueuse sont copécipités sous forme d'oxyde de fer par passage en milieu alcalin. On obtient tout d'abord de la magnétite Fe_3O_4 qui s'oxyde ensuite en maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ beaucoup plus stable. Le ratio $\text{Fe}[\text{II}]/\text{Fe}[\text{III}]$ et le pH permettent de contrôler la taille des grains dont le diamètre moyen vaut typiquement 10 nm. La FIGURE 1.1 présente l'allure typique d'un ferrofluide observé en microscopie électronique. Les grains ne sont pas des sphères parfaites mais ont plutôt un aspect très rugueux. La photo met aussi en évidence la polydispersité en taille des ferrofluides.

Leur distribution de taille est bien décrite par une fonction log-normale de diamètre moyen d_0 et

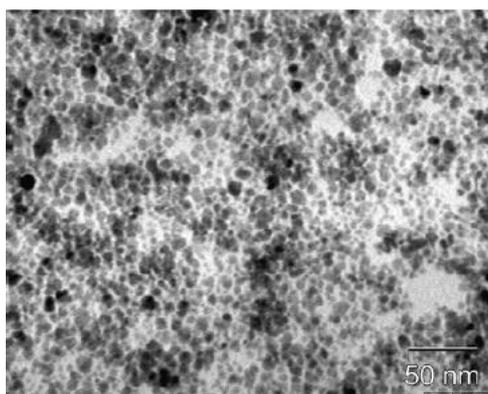


FIGURE 1.1 – Cliché de microscopie électronique en transmission (TEM) d'un ferrofluide. D'après [Montagne et al., 2002].

d'écart-type s [Bacri et al., 1986] :

$$f(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}sd} \exp\left(-\frac{\ln^2(d/d_0)}{2s^2}\right) \quad (1.1)$$

Pour un ferrofluide de diamètre moyen 13 nm et d'écart-type 0.2, qui sont des valeurs typiques, la distribution de taille a l'allure présentée FIGURE 1.2. D'après cette distribution, la polydispersité observée FIGURE 1.1 peut être quantifiée. Par exemple, 9.5% des grains ont un diamètre inférieur à 10 nm, alors que 1.6% ont un diamètre supérieur à 20 nm.

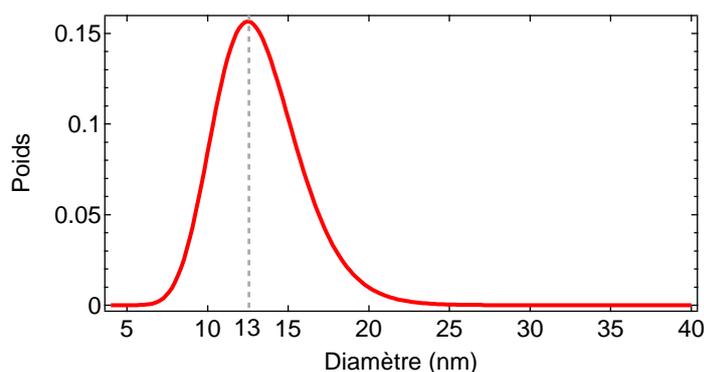


FIGURE 1.2 – Distribution log-normale de paramètres $d_0 = 13$ nm et $s = 0.2$

1.2 Propriétés magnétiques d'un ferrofluide

La structure cristallographique de la maghémite est cubique et peut être décomposée en deux sous-réseaux occupés par les ions Fe[II] et Fe[III]. Comme ces deux types d'ions possèdent des spins

différents, les moments magnétiques des deux sous-réseaux ne se compensent pas : la maghémite est dite ferrimagnétique et possède une aimantation permanente. Cependant, pour minimiser l'énergie magnétique créée, un bloc macroscopique de maghémite se divise en plusieurs domaines magnétiques, dits domaines de Weiss, dont l'aimantation possède une orientation différente [Feynman et al., 1964]. Le moment magnétique global du matériau est ainsi très faible.

A l'interface entre les domaines se trouvent des zones où l'orientation des spins atomiques change progressivement : ce sont les parois de Bloch. La création de telles interfaces a un coût énergétique et par conséquent, en-dessous d'une taille critique, il devient défavorable de séparer un matériau en domaines. Cette taille critique vaut environ 80 nm pour la maghémite [Butler and Banerjee, 1975].

Ainsi, les grains qui composent les billes magnétiques sont de taille suffisamment faible pour être monodomaines. On peut donc les représenter par un unique moment magnétique μ orienté dans une unique direction. La valeur de μ est proportionnelle au volume du grain selon la relation :

$$\mu = \pi \frac{d^3}{6} M_{\text{Fe}_2\text{O}_3} \quad (1.2)$$

où $M_{\text{Fe}_2\text{O}_3}$ est l'aimantation volumique d'un bloc de maghémite monodomaine.

1.3 L'anisotropie magnétique

La direction que prend le moment magnétique dans le grain n'est pas aléatoire. Il existe toujours une direction privilégiée appelée direction de facile aimantation. Elle résulte d'une anisotropie magnétique qui peut avoir plusieurs origines : magnétocristalline, de forme ou de surface.

L'anisotropie magnétocristalline est une propriété intrinsèque du matériau considéré et provient de l'interaction entre les spins électroniques et le champ électrique créé par la structure cristalline (couplage spin-orbite). Pour la maghémite, les directions de facile aimantation correspondent aux axes cristallographiques $\langle 110 \rangle$ de la maille cubique [Birks, 1950]. On définit l'énergie d'anisotropie E_a comme la barrière d'énergie à franchir par le moment magnétique pour pivoter d'une direction facile (la plus favorable énergétiquement) à une direction perpendiculaire à celle-ci (la plus défavorable énergétiquement). C'est donc aussi la barrière à franchir par le moment pour changer de direction le long de son axe. E_a varie comme le volume de l'échantillon et l'on écrit $E_a = K_V V$ où K_V est une constante empirique positive dépendant du matériau. Pour la maghémite, $K_V \sim 10^4 \text{ J m}^{-3}$ [Birks, 1950].

Pour des particules non sphériques, l'anisotropie de forme peut jouer un rôle important. Pour une description rigoureuse de ce phénomène, on peut se reporter à Landau and Lifshitz [1960]. On donne ici une description qualitative. Commençons par introduire la notion de champ démagnétisant. Par analogie

avec l'électrostatique, on peut considérer qu'il se forme des pôles Nord et Sud (fictifs) de part et d'autre d'un objet magnétique plongé dans un champ externe, de la même façon que des charges positives et négatives s'accumulent à la surface d'un dipôle électrique (FIGURE 1.3). Ces pôles créent à l'intérieur de l'objet un champ magnétique dans la direction opposée au champ extérieur. Dans le cas de la FIGURE 1.3, on conçoit que le nombre de pôles sera plus grand si le champ est orienté dans la direction du petit axe de l'ellipsoïde que selon son grand axe car le flux du champ à travers le grain est plus grand, d'où un champ démagnétisant plus important. Il se crée donc une direction de facile aimantation selon le grand axe. En revanche, dans le cas d'une sphère, le champ démagnétisant est identique dans toutes les directions et l'anisotropie de forme n'existe pas. L'anisotropie de forme varie également comme le volume.

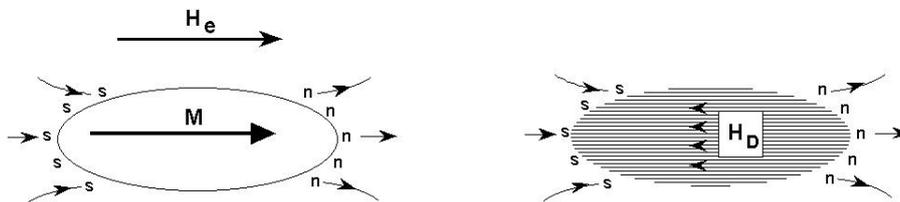


FIGURE 1.3 – *Gauche* : formation de pôles apparents Sud (s) et Nord (n) dans un champ externe. *Droite* : Champ démagnétisant H_D créé par ces pôles à l'intérieur de l'objet. D'après [Moskowitz, 1991].

Enfin, l'existence d'une couche surfacique désordonnée où les spins sont désorientés est à l'origine de l'anisotropie de surface [Néel, 1954], qui peut devenir prépondérante lorsque la taille diminue et que le ratio surface/volume augmente. L'axe d'anisotropie créé est localement perpendiculaire à la surface. L'effet se compense donc pour des particules sphériques et ne peut exister que lorsqu'il existe déjà une anisotropie de forme. L'énergie d'anisotropie est alors exprimée par $E_a = K_S S$.

Dans le cas des grains de maghémite qui composent les billes magnétiques, il est difficile d'identifier la forme d'anisotropie mise en jeu. Plusieurs études, telle celle de Dormann et al. [1996] mettent en évidence une origine surfacique de l'anisotropie. Par des expériences de FMR (FerroMagnetic Resonance), Gazeau et al. [1998] concluent également que l'anisotropie est d'origine surfacique et de plus uniaxiale. L'irrégularité de la forme des grains (FIGURE 1.1) et l'existence d'une légère ellipticité (de l'ordre de 1.2) [Dubois, 1997] observées en microscopie électronique sont en accord avec ces résultats. Mais étant donné la polydispersité en taille des particules, il est difficile d'exclure des effets magnéto-cristallins pour les gros objets au moins.

Dans la suite, par souci de simplicité, le comportement dynamique des grains sera décrit comme s'il n'existait qu'un seul axe d'aimantation facile. Cette description peut facilement être extrapolée à une situation à plusieurs axes.

1.4 Couplage entre un grain et son moment magnétique

Le paramètre adimensionné $\sigma = \frac{E_a}{k_B T}$ décrit l'amplitude du couplage entre le grain et son moment magnétique :

- (i) Lorsque $\sigma \ll 1$, le moment magnétique est complètement décorrélé de l'axe de facile aimantation.
- (ii) Lorsque $\sigma \sim 1$, le moment magnétique reste en moyenne orienté selon l'axe de facile aimantation mais sa direction peut fluctuer, notamment basculer d'un sens à l'autre de l'axe. Ce type de grain est souvent qualifié de *soft dipole*.
- (iii) Lorsque $\sigma \gg 1$, on se situe dans la limite du dipôle rigide : le moment magnétique est rigidement lié à son axe de facile aimantation et ne peut pas basculer d'un sens à l'autre.

La valeur de σ dépend fortement de la taille des grains puisque E_a varie comme d^2 ou d^3 . Pour la maghémite, $\sigma \sim 1$ pour un diamètre des grains $d \sim 10$ nm [Gazeau et al., 1998]. Là encore, la polydispersité a des effets importants sur les propriétés du ferrofluide. Alors que les petits grains ont un couplage faible avec leur moment magnétique, les gros objets ont un comportement de type dipôle rigide.

En tenant compte de l'anisotropie magnétique, l'énergie du grain s'écrit (avec les notations de la FIGURE 1.4) :

$$U_{\text{grain}} = -\mu B(\vec{e} \cdot \vec{b}) - E_a(\vec{e} \cdot \vec{v})^2 \quad (1.3)$$

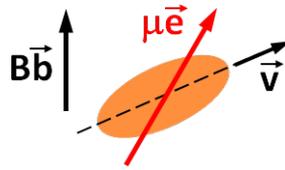


FIGURE 1.4 – Grain superparamagnétique dans un champ externe. \vec{b} , \vec{e} et \vec{v} sont des vecteurs unitaires dans la direction du champ, du moment magnétique et de l'axe de facile aimantation.

Soit en terme de variables réduites ξ et σ :

$$\frac{U_{\text{grain}}}{k_B T} = -\xi(\vec{e} \cdot \vec{b}) - \sigma(\vec{e} \cdot \vec{v})^2 \quad (1.4)$$

Cette expression met en évidence la compétition entre la force magnétique qui tend à aligner le moment magnétique dans le champ extérieur et le couplage dû à l'anisotropie qui tend à ramener le moment magnétique dans l'axe de facile aimantation.

1.5 Comportement des grains sous champ à l'équilibre

Détaillons maintenant l'effet de l'application d'un champ magnétique sur une population de grains en suspension. Les moments magnétiques vont s'orienter parallèlement au champ externe. Cet effet peut être analysé en mesurant l'aimantation de la suspension. A cause du couplage dû à l'anisotropie magnétique, les grains eux-mêmes vont aussi s'orienter. Pour analyser cet effet on suit l'évolution d'une grandeur liée au corps géométrique des grains : il s'agit de la biréfringence. Dans cette section, on ne décrira que le comportement des grains dans leur position d'équilibre sous champ. La façon dont cet équilibre est atteint sera l'objet de la section suivante.

1.5.1 Évolution de l'aimantation avec le champ externe

Dans ce paragraphe on considère le comportement des moments magnétiques sans se préoccuper de celui du corps géométrique des grains, ce qui revient à considérer $\sigma \gg 1$ mais peut être généralisé à toutes les valeurs de σ .

Commençons par donner une définition plus précise du superparamagnétisme. Les moments des grains fluctuent et leur comportement est assimilable à celui des molécules d'un gaz paramagnétique parfait : à champ extérieur nul l'aimantation d'un échantillon de ferrofluide est nulle du fait de l'agitation thermique qui désoriente les grains. Sous champ externe, les moments s'alignent et l'aimantation augmente avec la valeur du champ jusqu'à atteindre une saturation. L'aimantation des grains, bien plus grande que celle de n'importe quel matériau paramagnétique classique, justifie le préfixe "super".

La théorie de Langevin du paramagnétisme est donc bien adaptée pour décrire le superparamagnétisme, en supposant que les grains n'interagissent pas entre eux. Calculons l'évolution de l'aimantation lorsqu'on applique un champ magnétique extérieur B . Chaque moment tend à s'aligner dans la direction de ce champ mais continue cependant de fluctuer. Il est donc utile d'introduire le paramètre de Langevin $\xi = \frac{\mu B}{k_B T}$ qui décrit la compétition entre alignement selon le champ et désorientation due à l'agitation thermique. L'énergie d'un moment magnétique est :

$$U = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\mu B \cos \theta \quad (1.5)$$

θ étant l'angle entre le moment et le champ (*cf.* FIGURE 1.5).

Notons que le système est invariant par rotation autour de l'axe z .

La probabilité de trouver un moment magnétique incliné de θ par rapport à B est proportionnelle

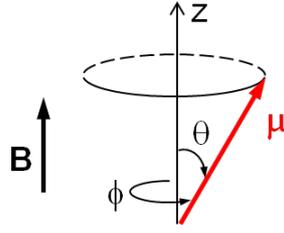


FIGURE 1.5 – Orientation d'un moment magnétique dans le champ extérieur selon z.

au facteur de Boltzmann $\exp(-U/k_B T) = \exp(\xi \cos \theta)$. La fonction de partition du système s'écrit :

$$Z = \sum_{\text{configs}} \exp\left(-\frac{U}{k_B T}\right) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\pi e^{\xi \cos \theta} \sin \theta d\theta = 2\pi \int_0^\pi e^{\xi \cos \theta} \sin \theta d\theta \quad (1.6)$$

Pour calculer l'aimantation volumique de l'échantillon M on ne s'intéresse qu'à la projection des moments magnétiques des grains sur l'axe z, les autres composantes étant moyennées à 0 par les fluctuations thermiques. En notant n le nombre de grains par unité de volume, on a :

$$M = n \langle \mu \cos \theta \rangle = \frac{1}{Z} 2\pi \int_0^\pi \mu \cos \theta e^{\xi \cos \theta} \sin \theta d\theta \quad (1.7)$$

L'intégration conduit à l'expression :

$$M = n\mu \left(\coth \xi - \frac{1}{\xi} \right) = n\mu \mathcal{L}(\xi) \quad (1.8)$$

où l'on appelle fonction de Langevin la fonction $\mathcal{L}(\xi)$.

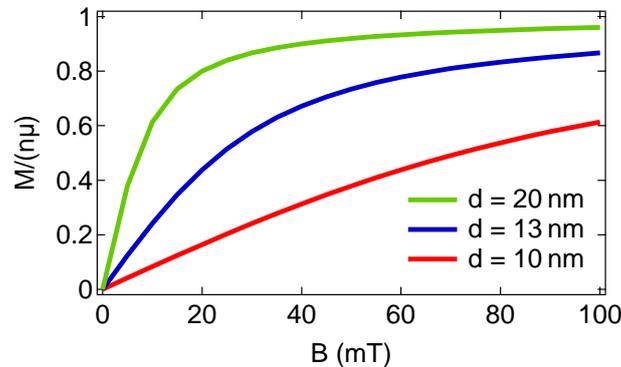


FIGURE 1.6 – Évolution de l'aimantation normalisée d'un ferrofluide pour différentes tailles de grains. Le moment magnétique des grains est calculé par la relation (1.2) avec $M_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 2.5 \cdot 10^5 \text{ A m}^{-1}$

L'allure de cette fonction est représentée FIGURE 1.6 pour trois ferrofluides rigoureusement mo-

nodisperses. Plus les grains sont gros et plus leur moment magnétique est grand donc plus l'échantillon s'aimante rapidement avec le champ. Les trois tailles de grains choisies sont présentes dans le ferrofluide dont la distribution est donnée FIGURE 1.2. On met ainsi en évidence les effets de polydispersité dans un ferrofluide : à faible champ, alors que la majorité des grains sont encore très désordonnés, les gros grains sont déjà complètement orientés. En conséquence l'aimantation mesurée sera plus forte qu'attendue.

1.5.2 Évolution de l'orientation des grains avec le champ externe

On observe maintenant la conséquence du couplage entre les grains et leur moment magnétique sur l'orientation des grains dans un champ magnétique externe. Avant de décrire la façon dont ils s'orientent, on expose brièvement le principe de la biréfringence, qui permet de suivre expérimentalement ce comportement.

1.5.2.1 Biréfringence d'un ferrofluide

A travers un matériau possédant une anisotropie optique, la lumière ne se propage pas de la même façon selon toutes les directions. Ses composantes selon les axes d'anisotropies sont modifiées de façon dissipative (dichroïsme), ou non-dissipative (biréfringence). Pour décrire le phénomène d'anisotropie optique à travers un échantillon de ferrofluide, on introduit une différence d'indice optique complexe $\Delta\tilde{n} = \tilde{n}_{//} - \tilde{n}_{\perp}$ entre une direction de propagation rapide parallèle à l'axe d'anisotropie et une direction de propagation lente perpendiculaire à cet axe. La partie réelle de $\Delta\tilde{n}$ décrit la biréfringence alors que sa partie imaginaire rend compte du dichroïsme.

Dans le cas d'un ferrofluide contenant des grains de maghémite, Jamon et al. [2009] ont mesuré $\frac{\text{Re}(\Delta\tilde{n})}{\text{Im}(\Delta\tilde{n})} \sim 80$. On négligera donc par la suite le dichroïsme de ces grains et on considérera $\Delta\tilde{n}$ réel.

Un échantillon de ferrofluide est optiquement isotrope à champ magnétique extérieur nul. Il acquiert un Δn qui augmente avec le champ puis sature. Cet effet peut être la conséquence soit de l'anisotropie intrinsèque des grains, soit de l'agrégation des grains en des chaînes anisotropes sous l'effet du champ [Scholten, 1980]. Dans le cas de ferrofluide soigneusement stabilisé, les grains n'interagissent pas entre eux et c'est le premier effet qui est observé [Hasmonay et al., 1998].

Notons qu'un échantillon de grains figés dans un gel de silice n'est pas biréfringent [Chaput et al., 1993]. L'anisotropie optique des grains n'est donc pas un effet induit par le champ externe mais bien une propriété intrinsèque. De même que l'anisotropie magnétique, elle peut être d'origine cristalline, surfacique ou de forme. L'expérience montre qu'elle est uniaxiale [Hasmonay et al., 1998], ce qui exclue une origine cristalline (*cf.* paragraphe 1.3), et qu'elle est liée à des effets de surface. De plus, pour un échantillon de ferrofluide macroscopique, l'axe rapide est confondu avec la direction du champ. Ces faits

expérimentaux tendent à montrer que l'axe de facile aimantation d'un grain et son axe rapide d'anisotropie optique sont fortement corrélés, voire confondus.

1.5.2.2 Évolution de la biréfringence avec le champ

L'origine microscopique de la biréfringence provient de la différence de polarisabilité électrique α entre l'axe d'anisotropie rapide et l'axe lent de chaque grain. Chaque grain porte une biréfringence $\alpha_{//} - \alpha_{\perp}$.

Dans la situation hypothétique où tous les grains seraient figés dans la direction du champ (soit $\sigma, \xi \rightarrow \infty$), la biréfringence d'un échantillon macroscopique de volume V contenant N grains serait $\delta n = \frac{N n_{solv}}{V} \frac{(\alpha_{//} - \alpha_{\perp})}{2}$, n_{solv} étant l'indice de réfraction de la phase continue (le calcul détaillé est donné en Annexe B). Comme N est une valeur difficilement accessible expérimentalement, on préfère généralement utiliser la susceptibilité électrique χ^{el} qui est une grandeur volumique : $\chi^{el} = \alpha/v$ (où v est le volume du grain). Ceci permet d'introduire la fraction volumique en grains $\phi = \frac{Nv}{V}$:

$$\delta n = \frac{\phi n_{solv}}{2} (\chi_{//}^{el} - \chi_{\perp}^{el}) = \phi \delta n_0 \quad (1.9)$$

On retiendra comme expression de la biréfringence intrinsèque [Scholten, 1980] :

$$\delta n_0 = \frac{n_{solv}}{2} (\chi_{//}^{el} - \chi_{\perp}^{el}) \quad (1.10)$$

Cependant, les grains sont soumis à l'agitation thermique et leur orientation dans le champ n'est pas parfaite. La valeur idéale de δn doit être pondérée pour chaque grain par un paramètre d'ordre $p = \frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{2}$ traduisant le degré de parallélisme de l'axe d'anisotropie et du champ appliqué, dont les directions forment un angle γ . La probabilité de trouver un grain incliné de γ par rapport à B est proportionnelle au facteur de Boltzmann $\exp(-U_{\text{grain}}/k_B T)$ où U_{grain} est donnée par l'expression (1.4).

Comme il a été fait au paragraphe 1.2, p doit être sommé sur l'ensemble des configurations énergétiques pour trouver la biréfringence de l'échantillon macroscopique :

$$\Delta n = \phi \delta n_0 \frac{1}{Z} \int p \exp\left(\frac{U_{\text{grain}}}{k_B T}\right) d\vec{\xi} d\vec{\sigma} \quad (1.11)$$

L'intégration aboutit à la séparation des deux variables ξ et σ [Hasmonay et al., 1998; Scholten, 1980] :

$$\Delta n = \phi \delta n_0 \mathcal{L}_2(\xi) K(\sigma) \quad (1.12)$$

où $\mathcal{L}_2(\xi) = 1 - 3\frac{\mathcal{L}(\xi)}{\xi}$ est la deuxième fonction de Langevin et $K(\sigma) = -\frac{1}{3} + \frac{d}{d\sigma} \ln \int_0^1 e^{\sigma x^2} dx$. Ces deux fonctions sont monotones et tendent respectivement vers 1 et $2/3$ quand leur argument est grand. Cette expression met en évidence le rôle de l'anisotropie magnétique : si le couplage entre le moment et son axe de facile aimantation est trop faible pour les maintenir dans la même direction, il sera impossible d'obtenir un état très ordonné, même à champ très fort. Sur la FIGURE 1.7 est tracée la biréfringence de ferrofluides monodisperses de même taille de grain que sur la FIGURE 1.6. Les effets de polydispersité sur la biréfringence sont amplifiés : d'une part le moment magnétique change, ce qui modifie la forme de la courbe ; d'autre part l'anisotropie change, ce qui modifie la valeur du plateau.

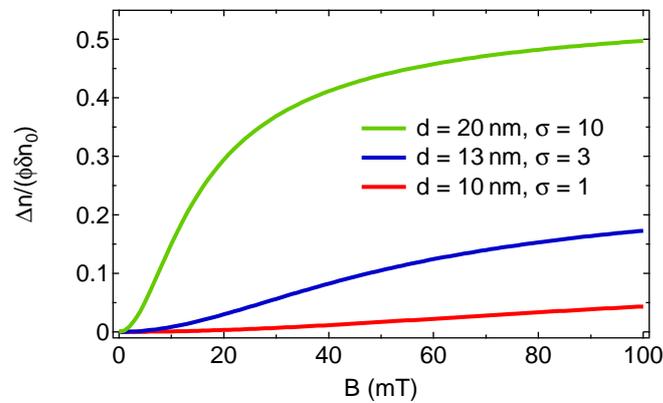


FIGURE 1.7 – Évolution de la biréfringence normalisée d'un ferrofluide pour différentes tailles de grains. σ est calculé en supposant une anisotropie magnétocristalline de constante $K_V = 10^4 \text{ J m}^{-3}$.

1.6 Dynamique de l'orientation des grains

Nous venons de décrire la situation d'équilibre des grains de ferrofluide sous champ externe. Décrivons maintenant leur dynamique, c'est à dire la façon dont ils tournent.

1.6.1 Effet des fluctuations thermiques

A la fois le grain et son moment magnétique sont soumis aux fluctuations thermiques. Comparons le temps caractéristique de relaxation correspondant aux deux types de fluctuations pour tenter d'évaluer celles qui dominent dans un ferrofluide.

Le temps caractéristique des fluctuations du moment magnétique par rapport à son axe de facile aimantation est donnée par le temps de Néel [Néel, 1949] :

$$\tau_N = \frac{1}{f_0} \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad (1.13)$$

où f_0 est une fréquence de test valant 10^9 Hz. Le facteur $\exp(E_a/k_B T)$ représente la probabilité de franchir la barrière d'énergie E_a . τ_N est extrêmement sensible à la taille des grains. Pour les valeurs typiques de diamètre de grain utilisées dans les FIGURES 1.6 et 1.7, les valeurs de τ_N sont données dans la TABLE 1.1.

diamètre	σ	τ_N
10 nm	1	3 ns
13 nm	3	18 ns
20 nm	10	35 μ s

TABLE 1.1 – Valeurs typiques de τ_N en considérant une anisotropie d'origine magnétocristalline de constante $K_V = 10^4 \text{ J m}^{-3}$.

Le temps caractéristique des fluctuations du grain est le temps brownien [Perrin, 1934] :

$$\tau_B = \frac{4\pi\eta r^3}{k_B T} \quad (1.14)$$

où r est le rayon des grains et η la viscosité du milieu. Pour des grains de 10 nm de diamètre en milieu aqueux, $\tau_B \sim 0.5 \mu\text{s}$.

Le corps géométrique des grains ne fluctue que de façon brownienne. En conséquence, la relaxation de la biréfringence sera toujours liée à τ_B . Mais si l'on s'intéresse à l'évolution de l'aimantation, c'est le plus rapide des deux temps qui dominera le comportement du moment. Or τ_N augmente beaucoup plus rapidement avec la taille que τ_B . On a $\tau_N \sim \tau_B$ pour $d = 18 \text{ nm}$, de sorte que dans le ferrofluide dont la distribution de taille est donnée FIGURE 1.2, 4,9% des grains ont $\tau_N > \tau_B$. Il est donc impossible de conclure sur le type de fluctuations qui prédomine dans un ferrofluide.

1.6.2 Couplage de l'orientation du grain et de son moment

Pour analyser le couplage entre l'orientation du grain et celle de son moment, décrivons le comportement du système {grain, moment} immédiatement après l'application d'un champ externe. De quelle façon tournent-ils pour relaxer vers le minimum d'énergie où moment magnétique et axe de facile aimantation sont tous deux alignés avec la direction du champ ?

Dans le cas du dipôle rigide, le couplage est très fort ($\sigma \gg 1$) et le grain suit strictement le mouvement de son moment. On peut faire l'approximation $\frac{U_{\text{grain}}}{k_B T} = \frac{U_{\text{mag}}}{k_B T} = -\xi(\vec{e}, \vec{b})$ (en utilisant les notations de la FIGURE 1.4). Le moment, et donc le grain, s'oriente dans le champ sous l'effet du couple magnétique :

$$C_{\text{mag}} = \vec{\mu} \times \vec{B} = \mu B \sin(\vec{e}, \vec{b}) \quad (1.15)$$

La vitesse est limitée par le couple visqueux. La relaxation de l'orientation du grain vers l'équilibre est monoexponentielle, avec une constante de temps $\tau = \frac{C_{\text{visq}}}{C_{\text{mag}}} \propto \frac{1}{\xi}$.

A l'inverse, lorsque le couplage est très faible ($\sigma \ll 1$), le mouvement du grain est décorrélé de celui de son moment magnétique. Le moment s'oriente sous l'effet de C_{mag} alors que le grain reste orienté aléatoirement et fluctue de façon brownienne avec un temps caractéristique τ_B .

Dans le régime du *soft dipole* où le couplage est fini ($\sigma \sim 1$), on doit considérer l'expression de l'énergie $\frac{U_{\text{grain}}}{k_B T} = -\xi(\vec{e} \cdot \vec{b}) - \sigma(\vec{e} \cdot \vec{v})^2$. Le mouvement couplé du moment magnétique et du grain est décrit par une équation différentielle de Fokker-Plank dont la résolution exacte ne peut être menée que dans certaines géométries de champ particulières comme celles examinées par Raikher et al. [2002]. Dans ce cas, la relaxation de l'orientation n'est pas monoexponentielle mais une série infinie d'exponentielles.

Une démarche alternative, décrite par Hasmonay et al. [2001], consiste à étudier le temps caractéristique du mouvement du grain. On donne ici une explication qualitative de cette approche.

Quand le moment magnétique s'écarte de l'axe de facile aimantation, un couple de rappel élastique dû à l'anisotropie C_{ani} fait tourner le corps géométrique du grain pour tendre à réaligner la direction du moment et celle de l'axe. C_{ani} devient limitant pour le mouvement du grain lorsque $C_{\text{mag}} > C_{\text{ani}}$, c'est à dire lorsque $\xi > \sigma$. Selon la valeur du champ, trois régimes sont à considérer pour décrire l'évolution du temps caractéristique de rotation. On supposera ici $\sigma > 1$.

- (i) $\xi \ll 1$: dans cette limite, l'agitation thermique du grain domine. Le couple magnétique est faible devant l'agitation thermique et devant le couplage entre le moment et le grain ($C_{\text{mag}} \ll k_B T, C_{\text{ani}}$). C_{ani} maintient le moment magnétique et l'axe de facile aimantation alignés : le grain se comporte comme un dipôle rigide. Il relaxe dans des directions aléatoires par mouvement brownien jusqu'à tomber dans la direction du minimum d'énergie (FIGURE 1.8). Le temps caractéristique est donc $\tau = \tau_B$. Une fois la position d'équilibre atteinte, le grain continue de fluctuer. L'amplitude de ces fluctuations a été décrite à la section précédente.

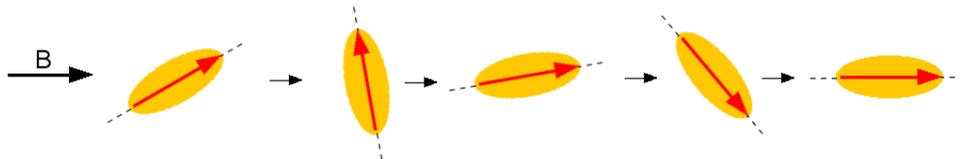


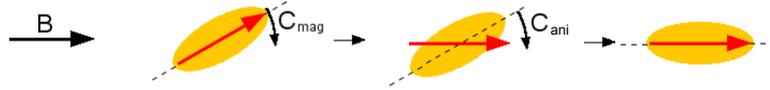
FIGURE 1.8 – Dynamique d'un grain pour $\xi \ll 1$.

- (ii) $1 \ll \xi < \sigma$: C_{mag} est maintenant suffisamment fort pour surmonter l'agitation thermique, mais pas assez pour surmonter le couplage entre le moment et le grain : l'approximation du dipôle rigide est encore valable (FIGURE 1.9). La vitesse est limitée par le couple visqueux et on a alors

$$\tau = \frac{C_{\text{visq}}}{C_{\text{mag}}} \propto \frac{1}{\xi}.$$


 FIGURE 1.9 – Dynamique d'un grain pour $1 \ll \xi < \sigma$.

(iii) $\sigma < \xi$: dans ce cas, $C_{\text{ani}} < C_{\text{mag}}$, et d'autre part $\tau_N \ll \tau_N$. Le moment magnétique s'aligne très vite dans le champ avec un temps caractéristique de l'ordre de τ_N . Puis dans un deuxième temps, le grain se réaligne avec son moment sous l'effet de C_{ani} (FIGURE 1.10). τ est le temps caractéristique de ce deuxième mouvement. Il est indépendant du champ et vaut $\tau_{\text{ani}} = \frac{\tau_B}{\sigma}$.


 FIGURE 1.10 – Dynamique d'un grain pour $\sigma < \xi$.

La FIGURE 1.11 résume l'évolution du temps caractéristique du mouvement du grain en fonction du champ.

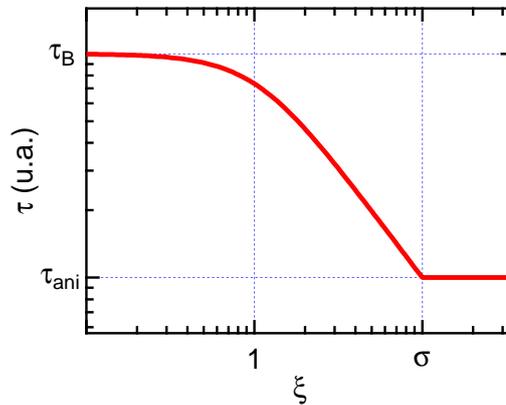


FIGURE 1.11 – Évolution du temps de relaxation de l'orientation d'un grain en fonction du champ adimensionné (en valeurs arbitraire). Les trois régimes détaillés dans le texte sont mis en évidence. D'après [Hasmonay et al., 2001].

1.6.3 Conclusion

Le mouvement de rotation de grains superparamagnétiques en suspension en réponse à un champ magnétique externe est bien compris et bien détaillé dans la littérature. Toute la complexité de ce com-

portement réside dans le couplage entre le moment magnétique et le corps géométrique du grain. Dans la limite d'un couplage nul ou infiniment grand, le mouvement peut être décrit analytiquement. Mais pour le *soft dipole* ($\sigma \sim 1$), le mouvement couplé du grain et du moment magnétique est complexe et ne peut être décrit que qualitativement dans le cas général.

Enfin, la valeur du couplage est très sensible à la taille des grains. Au sein d'un même ferrofluide, on trouvera donc des grains qui relaxent par des mécanismes différents et donc sur des échelles de temps très différentes.

Nous allons maintenant mettre en application ces notions théoriques pour caractériser le comportement du ferrofluide qui nous sert au laboratoire à fabriquer des billes magnétiques.

1.7 Caractérisation expérimentale du ferrofluide

Il s'agit dans cette section de caractériser par la méthode de biréfringence exposée à la section précédente le ferrofluide utilisé pour fabriquer les billes magnétiques. Ce travail de caractérisation des grains isolés est une première étape primordiale avant la caractérisation du comportement de l'assemblée de grains que représente une bille magnétique.

1.7.1 Caractéristiques physiques du ferrofluide

L'échantillon analysé est un ferrofluide fourni par Ademtech et synthétisé selon le protocole Massart [Massart, 1981]. Les billes que nous fabriquons au laboratoire sont obtenues à partir de ce ferrofluide. Celles produites par Ademtech proviennent d'un ferrofluide fabriqué selon le même procédé et possédant donc des caractéristiques similaires.

Ce ferrofluide est une dispersion de grains de maghémite dans l'octane à une concentration massique de 73.4% soit une fraction volumique de 0.147 (la maghémite ayant une densité de 5). La stabilité colloïdale de cette dispersion est assurée par l'ajout d'environ 25% vol/vol d'acide oléique, dont une grande partie s'adsorbe à la surface des grains. D'après Montagne et al. [2002], la quantité d'acide oléique en solution est inférieure à 10%.

Pour mesurer sa biréfringence, ce ferrofluide est redispersé à une fraction volumique de 10^{-4} dans de l'octane à 10 % vol/vol d'acide oléique. On s'assure ainsi que la stabilité colloïdale des grains n'est pas perturbée et que l'on ne formera pas d'agrégats sous champ magnétique. D'autre part, à cette fraction volumique, les phénomènes de diffusion multiple de la lumière dans l'expérience de mesure de la biréfringence sont négligeables.

L'analyse en DLS donne un diamètre hydrodynamique moyen des grains $d_0 = 13.6$ nm (FIGURE 1.12).

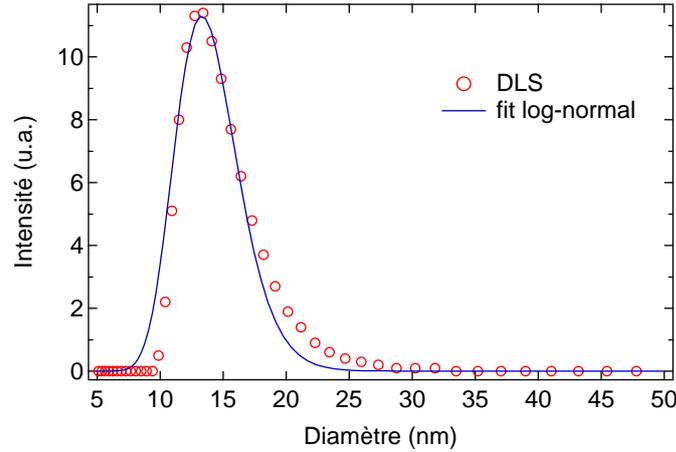


FIGURE 1.12 – Distribution de taille pondérée en nombre du ferrofluide Ademtech à partir duquel sont fabriquées les billes magnétiques et ajustement log-normal. La mesure est réalisée à une fraction volumique $\phi = 10^{-4}$.

L'ajustement de la distribution de taille observée par une fonction log-normale (expression 1.1) donne un écart-type $s = 0.25$. Notons que l'ajustement n'est pas parfait. Le ferrofluide contient d'une part moins de petits objets que ne le prévoit la distribution log-normale, et d'autre part plus de gros objets. Cette dernière observation est très importante, car comme on l'a vu précédemment, le couplage avec le champ augmente très vite avec le volume des grains.

1.7.2 Dispositif expérimental

Pour mesurer la biréfringence d'un échantillon de ferrofluide, nous avons monté au laboratoire un dispositif expérimental inspiré de celui décrit par Hasmonay et al. [1998]. Il est schématisé FIGURE 1.13 : l'échantillon est placé dans un champ magnétique homogène créé par deux bobines de Helmholtz, entre polariseur et analyseur croisés dont l'extinction vaut environ $5 \cdot 10^4$. L'échantillon se trouve dans une cuve en quartz non biréfringente d'épaisseur $e = 1$ cm. La lumière d'un laser Hélium-Néon de longueur d'onde $\lambda = 632.8$ nm qui traverse le dispositif est mesurée au moyen d'un photomultiplicateur relié à un multimètre numérique.

Après le polariseur, la lumière est polarisée linéairement selon \vec{X} (FIGURE 1.13) et le champ électrique de l'onde a pour expression :

$$E = \begin{pmatrix} E_0 \cos \omega t \\ 0 \end{pmatrix}_{(\vec{X}, \vec{Y})} = \begin{pmatrix} \frac{E_0}{\sqrt{2}} \cos \omega t \\ \frac{E_0}{\sqrt{2}} \cos \omega t \end{pmatrix}_{(\vec{x}, \vec{y})} \quad (1.16)$$

La traversée de l'échantillon de ferrofluide induit une différence de chemin optique $e\Delta n(B)$ entre

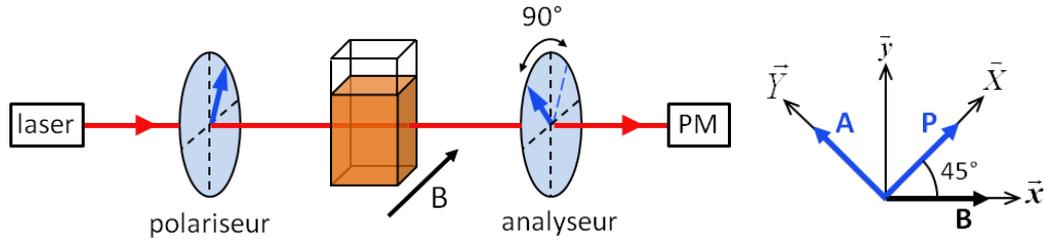


FIGURE 1.13 – *Gauche* : dispositif expérimental de mesure de la biréfringence d'un ferrofluide. *Droite* : définition des axes des repères (\bar{x}, \bar{y}) lié au champ et (\bar{X}, \bar{Y}) lié au montage polariseur (P) - analyseur (A).

la composante $E_{\bar{x}}$ (axe rapide) et la composante $E_{\bar{y}}$ (axe lent). Le déphasage correspondant est :

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} e \Delta n(B) \quad (1.17)$$

D'où l'expression de E :

$$E = \begin{pmatrix} \frac{E_0}{\sqrt{2}} \sqrt{T} \cos \omega t \\ \frac{E_0}{\sqrt{2}} \sqrt{T} \cos(\omega t - \varphi) \end{pmatrix}_{(\bar{x}, \bar{y})} = \begin{pmatrix} E_0 \sqrt{T} \cos\left(\omega t - \frac{\varphi}{2}\right) \cos\left(\frac{\varphi}{2}\right) \\ E_0 \sqrt{T} \sin\left(\omega t - \frac{\varphi}{2}\right) \sin\left(\frac{\varphi}{2}\right) \end{pmatrix}_{(\bar{x}, \bar{y})} \quad (1.18)$$

où T est le coefficient de transmission lumineuse de l'échantillon. Sur le photomultiplicateur, on mesure :

$$I = \langle E_{\bar{y}}^2 \rangle_t = I_0 T \sin^2\left(\frac{\varphi}{2}\right) \quad (1.19)$$

En pratique, φ est petit. A titre d'exemple, $\varphi_{\max} = 11.5^\circ$ à saturation de la biréfringence sur la FIGURE 1.14. Dans notre montage, $I \sim \varphi^2$ est donc assez peu sensible à φ . Il est possible d'utiliser un montage plus complexe avec un modulateur photoélastique et un amplificateur à détection synchrone [Hasmonay et al., 1998] pour se placer dans des conditions où $I \sim \varphi$. La dynamique du signal mesuré est ainsi plus grande. Nous avons observé dans notre dispositif expérimental un signal assez fort ne nécessitant pas l'emploi de matériel supplémentaire pour être augmenté.

1.7.3 Étalonnage du montage

Pour étalonner le montage et connaître la valeur de I_0 , on introduit une lame demi-onde entre le polariseur et l'analyseur. Cette lame introduit une différence de chemin optique $\lambda/2$, soit un déphasage de π , entre son axe rapide et son axe lent. Si θ est l'angle entre l'axe du polariseur et l'axe lent de la lame, alors l'intensité mesurée en sortie est $I = I_0 \sin^2 2\theta$.

On déduit I_0 en faisant tourner la lame demi-onde.

L'avantage de cette technique par rapport à la mesure directe de I_0 en enlevant polariseur et analyseur du trajet optique est de tenir compte de l'imperfection du montage. En effet, d'une part, polariseur et analyseur ne sont pas parfaits : ils laissent passer une certaine quantité de lumière quand ils sont croisés. D'autre part, le réglage de la perpendicularité du polariseur et de l'analyseur n'est pas parfait lui non plus.

1.7.4 Évolution de la biréfringence du ferrofluide avec le champ

L'évolution de la biréfringence du ferrofluide en fonction de B est présentée FIGURE 1.14. La courbe est d'abord ajustée par l'expression (1.12). L'aimantation de la maghémite monodomaine des grains, mesurée par Ademtech, vaut $M_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 2.5 \cdot 10^5 \text{ Am}^{-1}$. Les deux paramètres du fit sont donc d_0 et le produit $\delta n_0 K(\sigma)$. d_0 permet d'ajuster la forme de la courbe alors que $\delta n_0 K(\sigma)$ est donné par la valeur du plateau. On trouve $d_0 = 13 \text{ nm}$ et $\delta n_0 K(\sigma) = 4.5 \cdot 10^{-2}$.

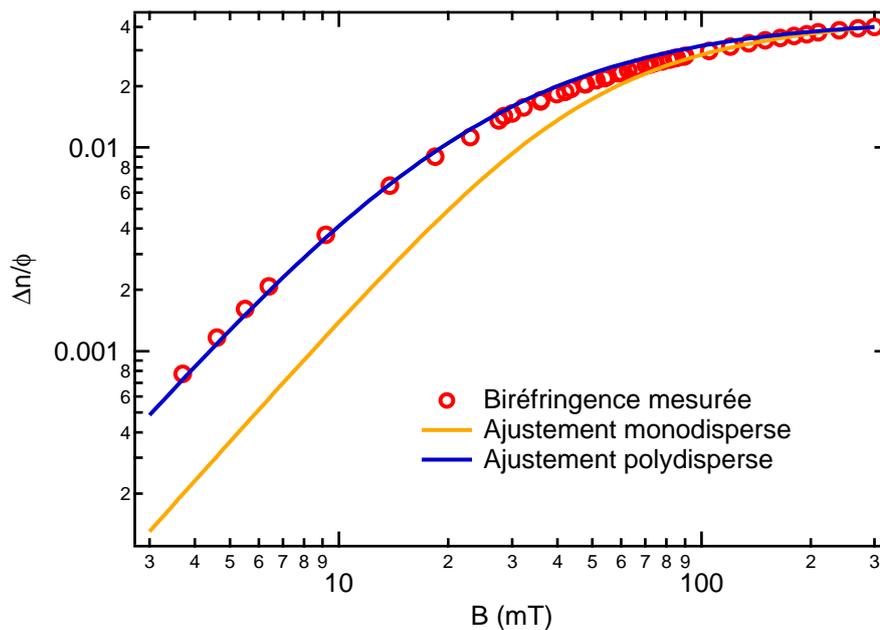


FIGURE 1.14 – Évolution de la biréfringence du ferrofluide en fonction du champ magnétique appliqué.

Ce modèle prévoit une biréfringence beaucoup plus faible à bas champ, alors que la partie de la courbe à fort champ est correctement ajustée. Ceci permet de mettre en évidence les effets de polydispersité dans le ferrofluide : à champ faible les grosses particules présentes dans l'échantillon sont déjà très ordonnées (cf. FIGURE 1.7). δn_0 étant proportionnel au volume, ces gros grains sont responsable d'une partie importante de la biréfringence totale.

Afin de tenir compte de ces effets, la FIGURE 1.14 présente un deuxième ajustement, où l'expres-

sion (1.12) est pondérée par la distribution de taille log-normale $f(d)$ (expression 1.1) de la façon suivante [Hasmonay et al., 1998] :

$$\Delta n = \delta n \frac{\int d^3 \mathcal{L}_2(\xi(d)) K(\sigma(d)) dd}{\int d^3 f(d) dd} \quad (1.20)$$

où l'on écrit $\xi(d) = \frac{M_{\text{Fe}_2\text{O}_3} \pi d^3 / 6}{k_B T}$ et $\sigma(d) = \sigma_0 \left(\frac{d}{d_0} \right)^2$. La forme de la courbe dépend maintenant des deux paramètres d_0 et σ_0 , et le plateau est ajusté par la valeur de δn_0 . L'ajustement donne $d_0 = 13$ nm et $\sigma_0 = 2 \pm 1$. Notons que la forme de la courbe est assez peu dépendante du paramètre σ_0 . Il est donc difficile de le déterminer avec précision. Cette expérience ne permet pas non plus de trancher entre une origine surfacique et volumique de l'anisotropie. En faisant varier σ comme d^3 , l'ajustement n'est qu'à peine moins bon.

De la valeur au plateau de la courbe on déduit $\delta n_0 = 0.2$, ce qui est en très bon accord avec la littérature : Hasmonay et al. [1998] trouvent également une valeur de 0.2 pour des particules de diamètre moyen et d'anisotropie moyenne équivalents synthétisées elles aussi par le protocole Massart.

1.7.5 Récapitulatif des caractéristiques du ferrofluide

La TABLE 1.2 rassemble toutes les caractéristiques de l'échantillon de ferrofluide analysé.

Fraction volumique de grains	$\phi = 10^{-4}$
Fraction volumique en acide oléique	10 %
Diamètre moyen des grains	$d_{\text{DLS}} = 13.6$ nm ; $d_{\text{bir}} = 13$ nm
Polydispersité (DLS)	$s = 0.25$
Moment magnétique moyen des grains	$\mu = 3 \cdot 10^{-19}$ A m ²
Anisotropie moyenne des grains	$\sigma_0 = 2$
Biréfringence moyenne des grains	$\delta n_0 = 0.2$
Temps caractéristiques à $d = 10$ nm	$\tau_N = 2.5$ ns, $\tau_B = 0.4$ μ s
Temps caractéristiques à $d = 13$ nm	$\tau_N = 7.5$ ns, $\tau_B = 0.85$ μ s
Temps caractéristiques à $d = 20$ nm	$\tau_N = 1.5$ μ s, $\tau_B = 3.1$ μ s

TABLE 1.2 – Caractéristiques de l'échantillon de ferrofluide utilisé.

On peut maintenant donner des ordres de grandeur pour les différents cas régissant la dynamique des grains sous champ (*cf.* paragraphe 1.6) : $\xi \sim 1$ correspond à $B \sim 13$ mT et $\xi \sim \sigma_0$ correspond à $B \sim 26$ mT. La dynamique des grains en fonction du champ est donc la suivante :

- (i) $B < 13$ mT : les grains sont essentiellement soumis à l'agitation thermique.
- (ii) $13 < B < 26$ mT : le couple magnétique est dominant.
- (iii) $B > 26$ mT : la force de rappel élastique donne le temps caractéristique d'orientation des grains, qui est maintenant constant. Mais les grains continuent de suivre les fluctuations de leur moment

magnétique, qui diminuent jusqu'à ce que le plateau de biréfringence soit atteint.

Cependant, comme on l'a vu ces régimes sont à nuancer en fonction de la distribution de taille du ferrofluide. Les temps caractéristiques des fluctuations pour différents diamètres de grain sont donnés dans la TABLE 1.3.

diamètre	σ	τ_N	τ_B
10 nm	0.9	2.5 ns	0.4 μ s
13 nm	2	7.5 ns	0.85 μ s
20 nm	7.3	1.5 μ s	3.1 μ s

TABLE 1.3 – Temps caractéristiques des fluctuations pour différents diamètres de grains dans l'échantillon de ferrofluide utilisé.

CHAPITRE 2

Étude expérimentale du couplage entre bille et champ magnétique

On s'intéresse à présent aux billes magnétiques fabriquées à partir du ferrofluide dont nous avons étudié les caractéristiques de façon approfondie au chapitre précédent.

L'utilisation de ces billes repose principalement sur leur propriété d'acquérir une aimantation sous champ magnétique qui disparaît dès que le champ est coupé. Cette propriété ne pourrait pas exister si les grains d'oxyde de fer qui les composent étaient des dipôles permanents.

Le modèle du dipôle induit classiquement utilisé pour décrire le comportement des billes magnétiques considère que les moments de tous les grains à l'intérieur d'une bille s'orientent très vite dans le champ pour donner naissance à l'aimantation globale de la bille. Ce modèle fait donc l'hypothèse que $\sigma \ll 1$ et par conséquent que les billes sont isotropes. Or on a mesuré dans le chapitre précédent une anisotropie moyenne des grains $\sigma_0 = 2$. Il existe donc un couplage entre ces grains et le champ magnétique. Ce couplage est-il suffisant pour expliquer le couple exercé sur les billes dans un champ magnétique tournant [Strick et al., 1996; Hu et al., 2004; Janssen et al., 2011] ?

Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer comment le couplage grain - champ peut être transposé à l'échelle de la bille entière. Il est possible tout d'abord que le processus de fabrication soit tel que les N grains d'une bille possèdent la même orientation. Dans ce cas, le couple appliqué à la bille serait simplement N fois le couple appliqué à un grain. Si les grains sont orientés aléatoirement, un effet global variant comme \sqrt{N} peut tout de même être envisagé. Enfin, la polydispersité de taille

des grains peut expliquer la présence de quelques dipôles permanents dans une bille, qui peuvent être responsables du couplage global sans toutefois compromettre la réponse superparamagnétique totale de la bille.

Les propriétés des grains d'oxyde de fer dans les billes sont les mêmes que dans le ferrofluide ayant servi à les fabriquer. La caractérisation de ce ferrofluide, réalisée au chapitre précédent, se révélera donc très utile pour la compréhension du couplage bille - champ.

Pour quantifier ce couplage bille - champ, nous utilisons une méthode optique inspirée de l'étude du ferrofluide permettant d'observer la façon dont les billes s'orientent dans un champ magnétique. Afin de déduire quel mécanisme est en jeu, on étudie l'influence du nombre de grains sur le couplage. Pour cela des billes de diamètre différent sont analysées.

Après avoir étudié la situation d'équilibre des billes sous champ, on s'intéressera ensuite à leur dynamique, pour tenter de valider les résultats obtenus à l'équilibre.

2.1 Description des billes utilisées

2.1.1 Nature et fabrication

Nous avons utilisé 5 lots de billes magnétiques de taille différente, obtenues par différents procédés de fabrication.

Le procédé de fabrication Ademtech, que nous utilisons également au laboratoire (*cf.* Annexe A), est basé sur l'émulsification dans l'eau d'un ferrofluide en phase organique [Bibette, 1993]. Le ferrofluide utilisé par Ademtech et dans notre laboratoire est identique à celui caractérisé au chapitre précédent. Afin d'obtenir des billes solides, l'émulsion subit ensuite un traitement thermique pour évaporer la phase organique. Cette étape peut éventuellement s'accompagner de la réticulation des gouttes d'émulsion par un polymère. Celui-ci apporte une meilleure stabilité colloïdale, c'est à dire qu'il prévient l'agrégation irréversible des billes, et permet d'encapsuler les grains de maghémite pour éviter qu'ils ne soient relargués en solution. Ceci est primordial pour les applications biologiques car les ion Fe sont susceptibles de perturber le fonctionnement de certaines protéines. Le polymère permet également la fonctionnalisation de la surface par des biomolécules. Le procédé de fabrication par émulsification permet d'obtenir des billes de 100 à 500 nm de diamètre avec une forte concentration de grains d'oxyde de fer qui les rend très magnétiques.

Pour atteindre de plus grand diamètres (de 1 à 5 μm), Dynal utilise la technique baptisée *activated swelling* permettant de fabriquer des billes de latex très poreuses à l'intérieur desquelles est introduit un mélange d'ions Fe[II] et Fe[III] qui précipitent sous la forme de maghémite [Ugelstad et al., 1993]. Il

s'agit en quelque sorte d'une synthèse Massart réalisée *in situ*. On fera donc l'hypothèse que les caractéristiques des grains sont semblables à celles du ferrofluide Ademtech. Après cette étape, la réticulation par un polymère bouche les pores et permet également la fonctionnalisation de la surface. L'avantage de cette technique réside dans l'obtention de billes très monodisperses. Mais la concentration de grains plus faible les rend moins magnétiques.

La TABLE 2.1 résume les caractéristiques principales des billes utilisées, à savoir leur diamètre mesuré en DLS, la présence ou non de polymère dans leur composition et leur origine.

Diamètre moyen (nm)	Réticulation polymère	Origine	$\frac{V_{\text{fer}}}{V_{\text{billes}}}$	N_{grains}
140	non	Laboratoire	35%	450
240	oui	Ademtech	20%	1200
400	oui	Ademtech	18%	5200
490	oui	Ademtech	18%	9300
1150	oui	Dynal	10%	69000

TABLE 2.1 – Caractéristiques des billes utilisées.

2.1.2 Nombre de grains dans les billes

Le but de cette étude est de relier le comportement des billes aux propriétés des grains qui les composent. Il est donc important de connaître le nombre de grains présents dans les billes.

Une évaluation de cette quantité est faite en analysant les données des fournisseurs. Ceux-ci donnent généralement le nombre de billes pour une masse donnée. La connaissance du diamètre moyen permet donc de calculer leur densité ρ_{bille} . Les billes fournies par Dynal et Ademtech sont des matériaux composites contenant de l'oxyde de fer de masse volumique $\rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3} \sim 5$, un polymère et de l'acide oléique dont on suppose qu'ils ont la même densité $\rho_{\text{pol}} \sim 1$. La quantité d'oxyde de fer dans la bille est obtenue par la relation :

$$\frac{V_{\text{fer}}}{V_{\text{bille}}} = \frac{\rho_{\text{bille}} - \rho_{\text{pol}}}{\rho_{\text{Fe}_2\text{O}_3} - \rho_{\text{pol}}} \quad (2.1)$$

La mesure de la masse volumique des billes synthétisées au laboratoire n'a pas été effectuée car elle consommerait un nombre trop important de billes pour être précise. Pour obtenir une estimation de la quantité d'oxyde de fer, on se base sur les travaux de Montagne et al. [2003] qui ont étudié la composition de billes de 190 nm fabriquées par émulsification d'un ferrofluide synthétisé selon le protocole Massart. Ces billes sont donc très semblables aux billes de 140 nm que nous avons fabriquées. Leur analyse par thermogravimétrie donne une fraction massique en oxyde de fer de 77%, soit une fraction volumique de

35%.

Connaissant le diamètre moyen d'un grain de ferrofluide (13 nm), on peut en déduire le nombre approximatif de grains à l'intérieur d'une bille (TABLE 2.1). On suppose pour cela que les grains à l'intérieur des particules fabriquées par le procédé Dynal ont les mêmes caractéristiques que ceux des billes faites à partir de ferrofluide.

2.2 Les billes sont optiquement anisotropes

La mesure de la biréfringence des grains de ferrofluide nous a permis d'étudier le couplage entre leurs degrés de libertés mécaniques et magnétiques et l'on aimerait transposer cette expérience à l'échelle des billes. On peut supposer que les grains confèrent leurs propriétés optiques aux billes et que celles-ci sont elles-mêmes anisotropes optiquement. Pour valider cette hypothèse, on étudie un échantillon de billes en DDLS (*Depolarised Dynamic Light Scattering*). Cette mesure est purement optique et réalisée à champ magnétique nul.

2.2.1 Principe de la DDLS

Lorsqu'une suspension colloïdale est éclairée par une source lumineuse, la diffusion de la lumière par les colloïdes crée des interférences constructives et destructives, construisant une figure d'interférence qu'il est possible d'observer. Les fluctuations de cette figure d'interférence sont directement liées aux fluctuations des objets en suspension. Leur étude est qualifiée de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et apporte de nombreux renseignements sur les objets diffusants [Koenderink, 2003]. Si la lumière incidente est polarisée, les fluctuations d'objets optiquement isotropes ne modifient pas la polarisation de la lumière diffusée. Dans le cas d'objets anisotropes, les fluctuations translationnelles laissent la polarisation inchangée alors que les fluctuations rotationnelles la font tourner légèrement. C'est ce dernier cas qui va nous intéresser dans la suite.

Le principe d'une expérience de diffusion de la lumière est schématisé FIGURE 2.1. L'échantillon est éclairé par un laser polarisé verticalement, c'est à dire perpendiculairement au plan de diffusion. En diffusion de la lumière polarisée (DLS), on mesure la lumière diffusée polarisée dans la même direction que la lumière incidente I_{VV} . En diffusion de la lumière dépolarisée (DDL), on mesure la lumière polarisée parallèlement au plan de diffusion I_{VH} . Dans nos notations, on rappelle en indice la polarisation de la lumière incidente et diffusée : V pour verticale et H pour horizontale.

En diffusion dynamique de la lumière, on s'intéresse à la fonction d'autocorrélation de l'amplitude de la lumière diffusée g^E qui dépend du temps et du vecteur d'onde $q = \frac{4\pi n_{solv}}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$ selon l'expression

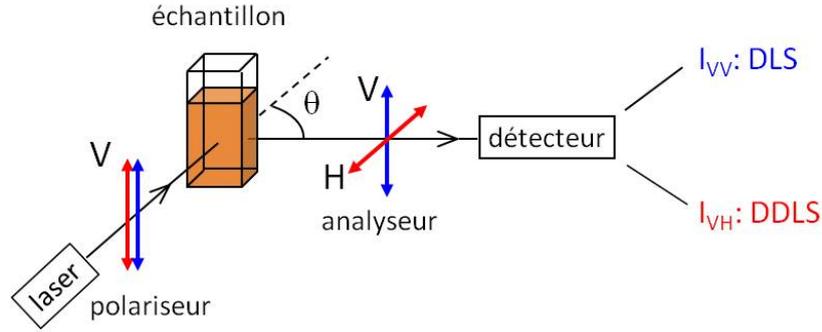


FIGURE 2.1 – Schéma d’une expérience de diffusion de la lumière. En bleu sont représentées les directions du polariseur et de l’analyseur dans les conditions d’une expérience de DLS. En rouge sont représentées celles utilisées en DDLS.

[Berne and Pecora, 2000] :

$$g_{VV}^E(q, t) = I_{VV}(q) e^{-\Gamma_{VV}(q) t} \quad (2.2)$$

$$g_{VH}^E(q, t) = I_{VH}(q) e^{-\Gamma_{VH}(q) t}$$

Si l’échantillon est constitué d’objets monodisperses en taille dont le coefficient de diffusion translationnel est D_t et le coefficient de diffusion rotationnelle est D_r , alors le le taux de relaxation s’écrit :

$$\Gamma_{VV}(q) = D_t q^2 \quad (2.3)$$

$$\Gamma_{VH}(q) = D_t q^2 + 6 D_r$$

La valeur initiale de g^E correspond à l’intensité moyennée dans le temps qui est mesurée par le détecteur, ou intensité intégrée [Berne and Pecora, 2000]. Elle renseigne sur la polarisabilité électrique des particules sondées. En effet :

$$I_{VV}(q) = N b(q)^2 \alpha_m^2 \quad (2.4)$$

$$I_{VH}(q) = \frac{1}{15} N b(q)^2 \beta^2$$

Dans ces expressions, $\alpha_m = \frac{\alpha_{//} + 2\alpha_{\perp}}{3}$ est la polarisabilité moyenne relativement au solvant et $\beta = \alpha_{//} - \alpha_{\perp}$ est l’anisotropie. Notons que ces quantités sont *a priori* complexes. $b(q)$ correspond à l’intensité diffusée par une sphère. En toute rigueur, g_{VV}^E , contient lui aussi un terme en β^2 , que l’on a négligé ici. En effet, l’anisotropie est en général très faible par rapport à la polarisabilité moyenne. On calculera par exemple dans la prochaine section que $\frac{\beta^2}{\alpha_m^2} \sim 10^{-4}$ pour les billes magnétiques étudiées, ce qui justifie

l'approximation faite ici.

Le rapport $\frac{I_{VH}}{I_{VV}} = \frac{1}{15} \frac{\beta^2}{\alpha_m^2}$ est appelé facteur d'anisotropie.

2.2.2 Réalisation pratique

L'expérience de DDLS est réalisée sur un appareil ALV/CGS-3 (Malvern Instruments) muni d'un laser de longueur d'onde 632.8 nm et d'un détecteur monté sur platine goniométrique. Ce détecteur mesure la fonction d'autocorrélation en intensité g^I de la lumière diffusée par l'échantillon. Celle-ci est liée à g^E par la relation de Siegert : $g^I = B(1 + A(g^E)^2)$, où A et B sont des constantes de normalisation.

Le laser est polarisé verticalement, avec un taux de polarisation 1:500. La lumière qui atteint l'échantillon possède donc une composante polarisée horizontalement dont l'amplitude vaut $I_H = I_V/500$. Devant le détecteur est placé un polariseur horizontal dont le taux d'extinction vaut environ 10^6 .

Soulignons que dans une expérience de DDLS parfaitement optimisée, un polariseur est également placé en sortie du laser pour supprimer complètement sa composante I_H . Cela n'a pas été possible ici, car il aurait fallu modifier l'alignement optique complexe placé devant le laser. Une autre technique couramment employée en DDLS est d'adapter l'indice des particules à celui du solvant [Koenderink, 2003] pour rendre invisible la contribution des fluctuations translationnelles proportionnelles à α_m . Cela n'est bien sûr pas envisageable ici.

Dans notre expérience imparfaitement optimisée, il est donc nécessaire de considérer 4 signaux pouvant atteindre le détecteur. En tenant compte de leur atténuation, ce sont : I_{VH} ; $\frac{I_{HV}}{500 \times 10^6}$; $\frac{I_{VV}}{10^6}$; $\frac{I_{HH}}{500}$. I_{HV} et I_{HH} ont les mêmes propriétés que I_{VH} et I_{VV} respectivement. On peut donc négliger les termes suivants : $\frac{I_{HV}}{500 \times 10^6} \ll I_{VH}$ et $\frac{I_{VV}}{10^6} \ll \frac{I_{HH}}{500}$. Dans le cas de nos billes, on s'attend à une anisotropie optique faible : $\beta \ll \alpha$ et par conséquent $\frac{I_{HH}}{500} > I_{VH}$. Il y a donc lieu de tenir compte de ce terme dans l'expression de g^E :

$$g_{DDLS}^E = \frac{I_{HH}}{500} e^{-\Gamma_{VV} t} + I_{VH} e^{-\Gamma_{VH} t} \quad (2.5)$$

En utilisant la relation de Siegert, le signal mesuré par le détecteur peut s'écrire, au premier ordre en I_{VH} :

$$g_{DDLS}^I \sim 1 + \left(\frac{I_{HH}}{500}\right)^2 e^{-2\Gamma_{VV} t} + 2 \frac{I_{HH}}{500} I_{VH} e^{-(\Gamma_{VV} + \Gamma_{VH}) t} \quad (2.6)$$

Ce signal présente deux taux de relaxation :

$$\Gamma_{VV}^I = 2\Gamma_{VV} = 2 D_t q^2 \quad (2.7)$$

$$\Gamma_{VH}^I = 2\Gamma_{VV} + \Gamma_{VH} = 2 D_t q^2 + 6 D_r$$

En pratique, cela signifie que le signal mesuré dans notre expérience décroît toujours avec deux temps caractéristiques : un lent ($1/\Gamma_{VV}^I$) et un rapide ($1/\Gamma_{VH}^I$).

L'ajustement par une double exponentielle permet de les séparer, à la condition que ceux-ci ne soient pas trop proches. Pour cela, on cherche à maximiser $\frac{\Gamma_{VH}^I}{\Gamma_{VV}^I} \sim \frac{1}{r^2}$. Cette condition nous conduit à travailler avec les billes les plus petites possibles, soit celles de 140 nm.

Afin de se placer dans les mêmes conditions que celles de l'étude de la rotation sous champ (cf. section 2.3), les billes sont dispersées à une fraction volumique $\phi = 0.005\%$ dans un tampon contenant 80% de glycérol. La viscosité obtenue est mesurée par DLS : connaissant le diamètre réel d des billes, le diamètre apparent mesuré dans l'échantillon est $\frac{\eta}{\eta_{\text{eau}}}d$. On mesure une viscosité de 32 mPa s (soit 32 fois la viscosité de l'eau).

Les taux de relaxation mesurés sont présentés FIGURE 2.2. Sur ce graphe, $\Gamma_{VH}^I(q)$ et $\Gamma_{VV}^I(q)$ ont la même pente. Les composantes polarisée et dépolarisée de la lumière diffusée sont donc sensibles aux mêmes objets. L'extrapolation de $\Gamma_{VH}^I(q)$ à $q = 0$ donne un D_r correspondant à la rotation d'objets de diamètre 150 ± 3 nm en utilisant la formule d'Einstein. La diffusion de lumière dépolarisée observée est donc bien due aux billes isolées. Si elle était l'effet d'agrégats résiduels dans la suspension, on obtiendrait une valeur de D_r significativement différente. Pour des doublets par exemple, on mesurerait $\frac{6D_r}{2.74} = 25 \text{ s}^{-1}$ [Carrasco and de la Torre, 1999] qui est une valeur clairement incompatible avec nos mesures. Les billes sont donc bien optiquement anisotropes.

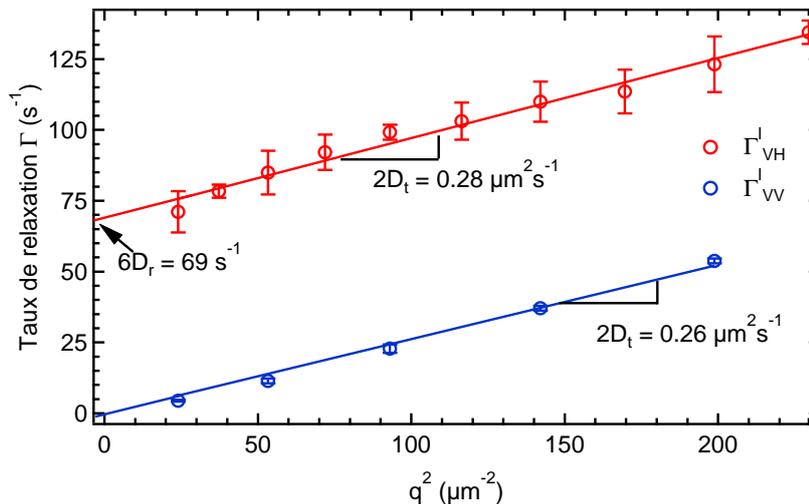


FIGURE 2.2 – Taux de relaxation mesurés à champ $B = 0$ sur un échantillon de billes de 140 nm dans 80% de glycérol. Barres d'erreur : écart-type correspondant à la répétition d'au moins 4 mesures, elles-mêmes moyennées sur 20 runs successifs.

L'analyse de l'intensité intégrée sur le détecteur permet de quantifier l'anisotropie optique. Pour calculer le facteur d'anisotropie, on compare la valeur de l'intensité intégrée en DDLS à la valeur mesurée

sans polariseur devant le détecteur (expérience de DLS classique). En tenant compte du coefficient de transmission $T = 0.75$ du polariseur, on obtient :

$$\frac{I_{DDLS}}{I_{DLS}} = \frac{g_{DDLS}^I(q, t = 0)}{g_{DLS}^I(q, t = 0)} = \frac{T(I_{VH} + I_{VV}/500)}{I_{VV}} = \frac{T}{15} \frac{\beta^2}{\alpha_m^2} + \frac{T}{500} \quad (2.8)$$

Pour calculer l'anisotropie optique, on remarque que :

$$\frac{\beta^2}{\alpha_m^2} = \left(\frac{\alpha_{//} - \alpha_{\perp}}{\alpha_m} \right)^2 = \left(\frac{\chi_{//}^{el} - \chi_{\perp}^{el}}{\chi_m^{el}} \right)^2 = \left(\frac{\chi_{//}^{el} - \chi_{\perp}^{el}}{n_p^2 - 1} \right)^2 \quad (2.9)$$

L'indice de réfraction n_p de billes magnétiques fabriquées selon le même protocole que celles utilisées ici a été mesuré par Dreyfus et al. [2009]. Il vaut 1.7 à la longueur d'onde du laser. On en déduit alors :

$$\chi_{//}^{el} - \chi_{\perp}^{el} = 0.05 \pm 0.005 \quad (2.10)$$

L'erreur commise est assimilée à l'écart-type de la valeur mesurée à tous les angles de diffusion considérés sur la FIGURE 2.2.

En conclusion, nous avons montré l'existence d'une anisotropie optique dans les billes magnétiques que nous avons pu quantifier. Il est important d'insister sur l'absence de tout champ magnétique dans cette expérience de DDLS : l'existence d'une anisotropie intrinsèque aux billes nous permettra par la suite de justifier que les effets optiques observés sous champ magnétique ne sont pas induits par le champ.

L'expérience de DDLS ne permet pas de conclure si l'anisotropie optique observée est de la biréfringence ou du dichroïsme. Par contre elle donne une mesure précise du coefficient de diffusion rotationnelle des objets anisotropes observés. Cette mesure montre sans ambiguïté que ces objets sont des billes isolées et non des agrégats.

2.3 Système expérimental

L'existence d'une anisotropie optique des billes va nous permettre, de façon similaire à ce qui a été fait sur le ferrofluide, d'étudier la façon dont elles s'ordonnent sous l'influence d'un champ magnétique externe. L'expérience réalisée sur le ferrofluide n'est pas directement transposable aux billes magnétiques. La taille des billes, beaucoup plus grosses que les grains, implique un changement de l'échelle de temps et de champ magnétique sondés. Des phénomènes optiques négligeables à l'échelle des grains doivent maintenant être pris en compte. La propriété des billes de former des chaînes sous champ conduit

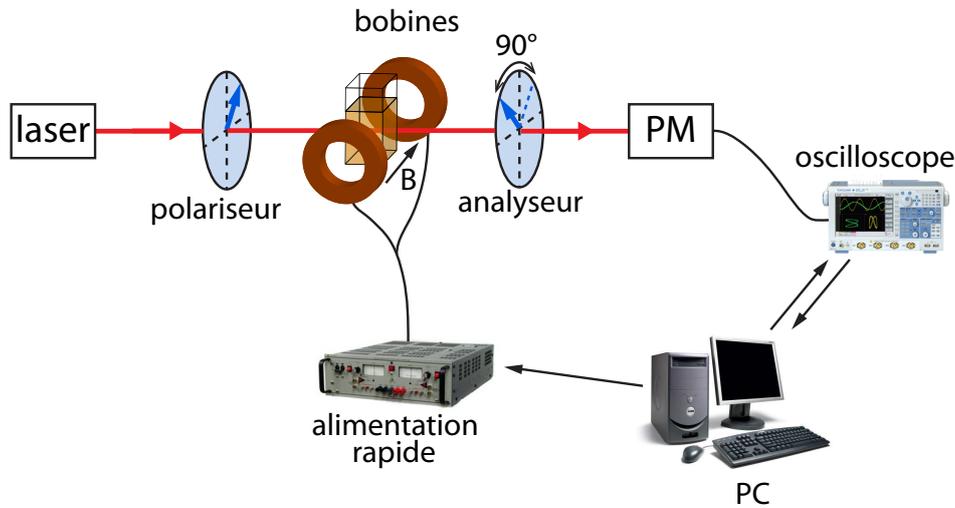


FIGURE 2.3 – Dispositif expérimental construit pour caractériser les propriétés magnétiques des billes.

à modifier le protocole expérimental pour mesurer uniquement le comportement des billes isolées. Nous décrivons toutes ces nouvelles conditions dans cette section.

2.3.1 Instrumentation

Un nouveau dispositif expérimental a été construit sur la base de celui utilisé pour le ferrofluide (FIGURE 2.3). Afin de pouvoir appliquer des créneaux de champ magnétique très courts et enregistrer la réponse optique des billes dans le même temps, le système est entièrement piloté par ordinateur via LabView. Les bobines sont alimentées par un amplificateur rapide haute puissance (Kepco BOP 100-4M, 400 W). La conception d'un circuit électrique RLC adapté permet de diminuer le temps de montée du courant dans les bobines et donc du champ magnétique créé à moins de 5 ms. Le signal électrique en sortie du photomultiplicateur est enregistré par un oscilloscope numérique (Yokogawa DLM 2024).

Le déclenchement de l'acquisition des données par l'oscilloscope numérique est synchronisé avec l'envoi du courant dans les bobines. Ceci permet une accumulation du signal sur plusieurs créneaux de champ successifs. Le signal mesuré par le photomultiplicateur étant relativement faible, notamment à bas champ, cette technique est très efficace pour éliminer le bruit. A titre indicatif, le signal mesuré à 1.3 mT sur la FIGURE 2.6 équivaut à une rotation de la polarisation de la lumière à travers l'échantillon de 0.05° . Les signaux les plus faibles sont accumulés sur 20 cycles. Une fois accumulé, le signal est traité par le logiciel IgorPro. Après soustraction de la ligne de base, l'anisotropie optique est extraite selon le calcul présenté ci-après.

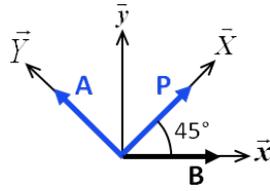


FIGURE 2.4 – Définition des axes des repères (\vec{x}, \vec{y}) lié au champ et (\vec{X}, \vec{Y}) lié au montage polariseur (P) - analyseur (A).

2.3.2 Calcul de l'intensité lumineuse mesurée

Le calcul du signal optique à travers une suspension de ferrofluide qu'on trouve couramment dans la littérature et que nous avons en partie reproduit au paragraphe 1.7.2 est établi pour un échantillon biréfringent seulement. Nous reprenons donc ici ce calcul dans un cadre plus général en considérant biréfringence et dichroïsme.

La FIGURE 2.4 rappelle la définition des axes pour le montage expérimental de la FIGURE 2.3. Après le polariseur, la lumière est polarisée linéairement selon \vec{X} et le champ électrique de l'onde a pour expression :

$$E = \begin{pmatrix} E_0 \cos \omega t \\ 0 \end{pmatrix}_{(\vec{x}, \vec{y})} = \frac{E_0}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \cos \omega t \\ \cos \omega t \end{pmatrix}_{(\vec{X}, \vec{Y})} \quad (2.11)$$

L'échantillon de billes est optiquement anisotrope. On démontre en Annexe B qu'il est analogue à une lame d'indice de réfraction complexe $\tilde{n}_{\parallel} = n_{\parallel} + in'_{\parallel}$ selon \vec{x} et $\tilde{n}_{\perp} = n_{\perp} + in'_{\perp}$ selon \vec{y} . La traversée de l'échantillon de billes par la lumière introduit d'une part un déphasage $\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} l(n_{\parallel} - n_{\perp})$ de $E_{\vec{y}}$ par rapport à $E_{\vec{x}}$, et d'autre part une atténuation différente de ces deux composantes, traduites par les coefficients de transmission t_{\parallel} et t_{\perp} . D'où l'expression de E :

$$E = \frac{E_0}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} t_{\parallel} \cos \omega t \\ t_{\perp} \cos(\omega t - \varphi) \end{pmatrix}_{(\vec{x}, \vec{y})} = \frac{E_0}{2} \begin{pmatrix} t_{\parallel} \cos \omega t + t_{\perp} \cos(\omega t - \varphi) \\ -t_{\parallel} \cos \omega t + t_{\perp} \cos(\omega t - \varphi) \end{pmatrix}_{(\vec{X}, \vec{Y})} \quad (2.12)$$

Le photomultiplicateur mesure l'intensité lumineuse selon \vec{Y} :

$$I = \langle E_{\vec{Y}}^2 \rangle_t = I_0 \left(\frac{t_{\parallel}^2 + t_{\perp}^2}{2} - t_{\parallel} t_{\perp} \cos \varphi \right) \quad (2.13)$$

La faible valeur de l'anisotropie optique mesurée dans les expériences justifie l'approximation $\varphi \ll 1$. La

linéarisation du cosinus aboutit à :

$$I = \frac{I_0}{2} \left((t_{//} - t_{\perp})^2 + t_{//} t_{\perp} \varphi^2 \right) \quad (2.14)$$

Les coefficients d'atténuation vérifient [van de Hulst, 1957] :

$$t_i^2 = e^{-\frac{4\pi}{\lambda} n'_i l} \quad \text{avec } i = //, \perp \quad (2.15)$$

En pratique, les échantillons de billes étudiés sont très dilués et leur densité optique est faible, ce qui justifie la linéarisation de l'exponentielle : $t_i \sim 1 - \frac{2\pi}{\lambda} n'_i l$. D'où :

$$I = I_0 \frac{2\pi^2 l^2}{\lambda^2} \left((n'_{//} - n'_{\perp})^2 + t_{//} t_{\perp} (n_{//} - n_{\perp})^2 \right) \quad (2.16)$$

L'intensité lumineuse mesurée est donc la somme d'un terme de dichroïsme en $\delta n' = n'_{//} - n'_{\perp}$ et d'un terme de biréfringence en $\delta n = n_{//} - n_{\perp}$.

$$I = I_0 (\phi_v t)^2 \left(a (\delta n')^2 + b (\delta n)^2 \right) \quad (2.17)$$

Il n'a pas été possible de dissocier la contribution respective de la biréfringence et du dichroïsme dans nos expériences. On introduira donc dans la suite la transmission moyenne de la suspension $t^2 = t_{//} t_{\perp}$ et un terme générique d'anisotropie optique Δ , homogène à un déphasage et prenant en compte la biréfringence et le dichroïsme, tel que :

$$I = I_0 t^2 \Delta^2 \quad (2.18)$$

Ce déphasage est proportionnel au nombre d'objets optiquement actifs dans l'échantillon donc au nombre de billes.

2.3.3 Précautions pour mesurer le comportement des billes isolées

Sous champ, les billes magnétiques forment très rapidement des chaînes macroscopiques. Cet effet est indésirable pour notre étude du comportement individuel des billes. Pour limiter le chaînage, les échantillons de billes sont dilués à une fraction volumique de 0.005%. De plus, les billes sont dispersées dans un tampon contenant 80% de glycérol qui freine leur mouvement en augmentant la viscosité du milieu. La phase aqueuse de ce tampon contient 10 mM de MES à pH 5.5.

Dans ces conditions, la FIGURE 2.5 présente l'allure typique de l'évolution temporelle de l'anisotropie optique, enregistrée dans le dispositif expérimental de la FIGURE 2.3 pendant l'application d'un

créneau de champ magnétique de 10 mT. On distingue nettement deux événements : tout d'abord l'obtention rapide d'un plateau, puis une augmentation continue avec une vitesse plus lente.

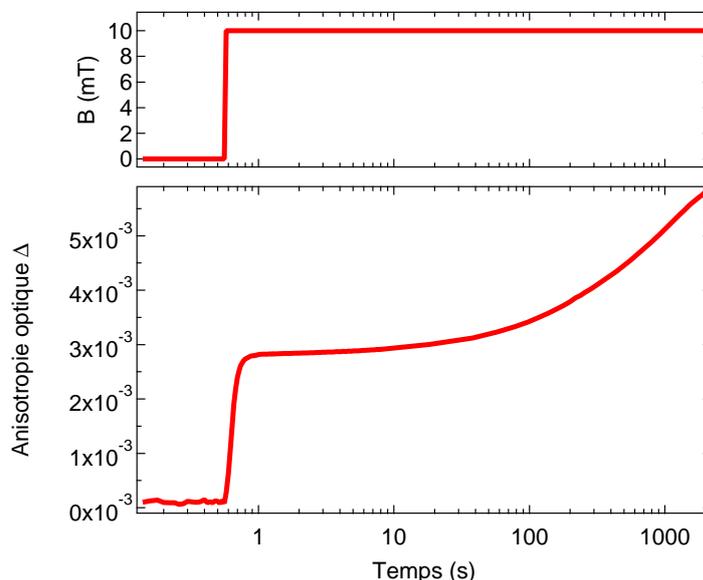


FIGURE 2.5 – Évolution de Δ en fonction du temps pour un échantillon de billes de 240 nm à l'application d'un créneau de champ magnétique.

La cinétique de formation de chaînes de billes magnétiques a été étudiée par de nombreux auteurs et plusieurs expressions de temps caractéristiques de chaînage ont été calculés [Promislow et al., 1995]. Dans nos conditions, l'ordre de grandeur de ces temps caractéristiques est la centaine de secondes. Il est donc exclu que le chaînage soit responsable de l'événement rapide de notre expérience, dont la durée est environ 200 ms. En revanche, l'événement le plus lent est certainement identifiable à la formation de chaînes. Dans la suite, on cherchera à appliquer des créneaux de champ magnétique les plus courts possibles pour s'affranchir de ce phénomène et se concentrer sur l'événement rapide.

La FIGURE 2.6 présente l'allure typique des courbes obtenues pour des billes de 240 nm.

Plusieurs arguments permettent d'affirmer que la variation de Δ observée quand on applique des créneaux de champ magnétique (FIGURE 2.6) est liée à l'orientation des billes :

- (i) L'obtention du plateau de Δ est réversible. A la coupure du champ, le signal retourne à la ligne de base avec un temps de relaxation du même ordre de grandeur qu'à l'établissement du champ.
- (ii) Lorsqu'on applique des créneaux de champ d'amplitude croissante, le Δ au plateau augmente puis sature, de façon analogue à ce que l'on observe avec le ferrofluide.
- (iii) Les temps de relaxation de la biréfringence à l'établissement et à la coupure du champ magnétique varient linéairement avec la viscosité des échantillons (*cf.* paragraphe 2.6.1). La variation

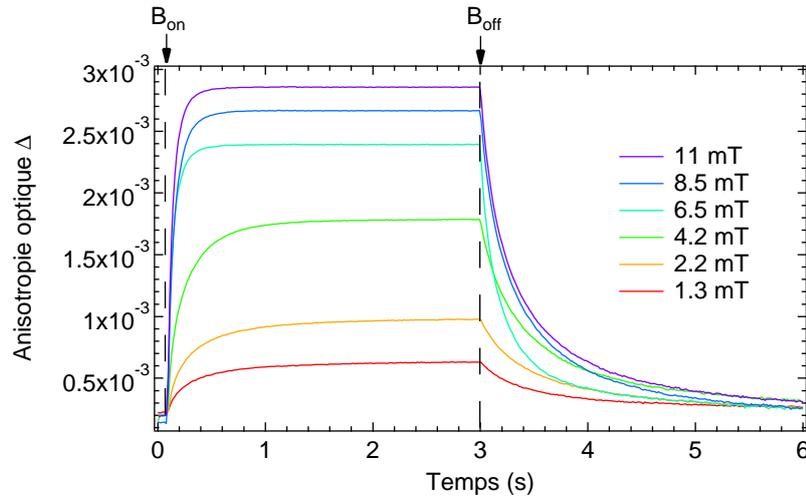


FIGURE 2.6 – Réponse à des créneaux de champ magnétiques d'un échantillon de billes de 240 nm.

d'anisotropie optique est donc bien liée à un mouvement des billes.

- (iv) Le signal reste plat lorsqu'un créneau de champ magnétique est appliqué à un échantillon de billes immobilisées dans un gel transparent de polyacrylamide. Cette expérience confirme de plus qu'aucune anisotropie induite par le champ n'apparaît dans les billes.
- (v) Il n'y a pas d'effet de diffusion multiple dans le système.

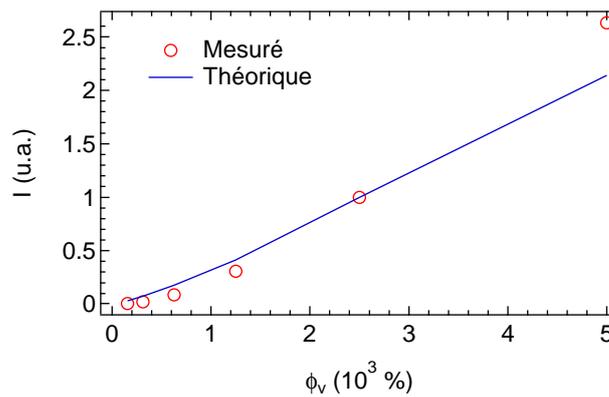


FIGURE 2.7 – Intensité lumineuse en fonction de ϕ_v mesurée sous un champ magnétique constant de 20 mT pour les billes de 240 nm. La courbe est ajustée avec l'expression $\frac{I}{I_{0.0025\%}} = \frac{t^2}{t_{0.0025\%}^2} \frac{\phi_v^2}{0.0025^2}$.

Pour vérifier la propriété (v), on mesure $I(\phi_v)$ à champ magnétique $B = 20$ mT constant pour des billes de 240 nm (FIGURE 2.7). La courbe est normalisée par $I(\phi_v = 0.0025\%)$ et ajustée par l'expression $\frac{I}{I_{0.0025\%}} = \frac{t^2}{t_{0.0025\%}^2} \frac{\phi_v^2}{0.0025^2}$. A titre indicatif, $t^2 = 0.68$ pour $\phi_v = 0.005\%$. Dans le régime dilué où la diffusion

multiple est négligeable, on s'attend à ce que I varie comme ϕ_v^2 (cf. Annexe B). Ce comportement est vérifié pour $\phi_v < 0.0025\%$. Il n'est plus tout à fait vrai à $\phi_v = 0.005\%$ où l'on a réalisé les expériences. Nous avons fait ce compromis pour avoir suffisamment de signal.

2.4 Comportement des billes isolées à l'équilibre sous champ

On a montré dans les paragraphes précédents que l'augmentation de l'anisotropie optique d'un échantillon de billes magnétiques sous champ est liée à l'orientation de ces billes. On observe dans cette section l'évolution de l'anisotropie optique à l'équilibre en fonction du champ appliqué pour les billes de 240 nm. Sous champ, les billes sont en moyenne orientées mais leur direction continue de fluctuer. Mesurer l'anisotropie optique à l'équilibre revient donc à utiliser l'agitation thermique pour explorer le puits de potentiel dans lequel évoluent les billes. On en déduira de nombreuses informations sur le couplage entre les billes et le champ appliqué.

La FIGURE 2.8 donne la courbe expérimentale de Δ en fonction du champ pour les billes magnétiques de 240 nm de diamètre.

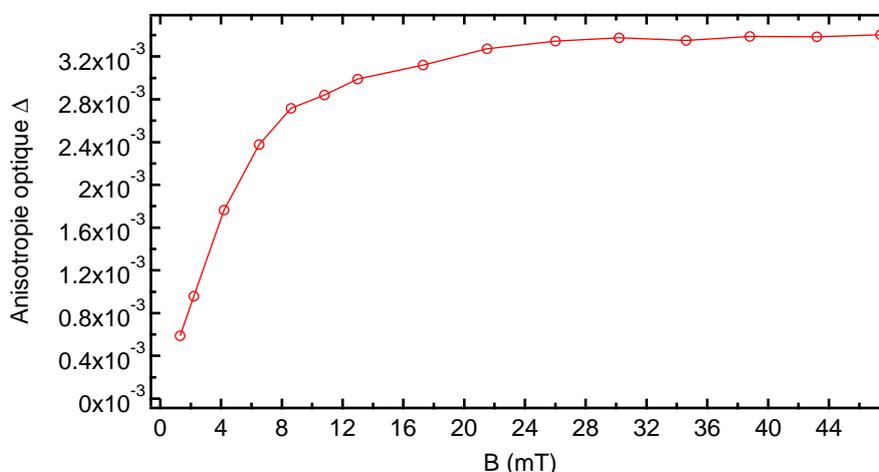


FIGURE 2.8 – Évolution de l'anisotropie optique des billes magnétiques de 240 nm en fonction du champ. L'angle de rotation de la polarisation correspondant à $\Delta = \Delta_{\text{sat}}$ vaut 0.1° .

Avant d'étudier les mécanismes possibles de couplage entre billes et champ, la question se pose d'abord de savoir dans quelle mesure les grains peuvent bouger à l'intérieur d'une bille. Des éléments de réponse existent pour les billes de 140 nm que nous avons fabriquées. Tout d'abord, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse de Montagne et al. [2003] montre que la fraction volumique en octane de billes similaires à celles de 140 nm est inférieure à 5%. L'acide oléique et l'oxyde de fer constituent donc la quasi-totalité d'une bille, qui est ainsi assimilable à un solide. Ensuite, on peut faire l'analogie

entre les billes et des ferrofluides très concentrés tels que ceux étudiés par [Wandersman et al., 2009]. Ces auteurs ont observé que le temps caractéristique de rotation des grains en réponse à un créneau de champ magnétique diverge lorsque la fraction volumique dépasse une valeur critique située entre 20 et 25%. Dans les billes où cette fraction volumique dépasse 30%, le mouvement des grains est donc extrêmement lent, voire impossible.

Dans le cas des billes Ademtech fabriquées à partir de ferrofluide mais réticulées par un polymère, la fraction volumique en octane est vraisemblablement aussi inférieure à 5%. La nature exacte du polymère est inconnue, mais son poids moléculaire doit être élevé pour assurer une bonne encapsulation, ce qui est défavorable au mouvement des grains.

Pour les billes Dynal, on dispose de moins d'éléments. Mais le fait que la structure polymère des billes soit d'abord gonflée pour inclure les grains puis contractée de nouveau laisse à penser que les grains sont maintenus fermement par le polymère.

On fait donc l'hypothèse que les grains sont figés à l'intérieur des billes, et ce dans une orientation aléatoire. Comment peut-il exister un couplage entre une telle assemblée et le champ magnétique appliqué ? Autrement dit, comment la réaction individuelle de chaque grain à l'application du champ magnétique permet-elle à une assemblée de grains pointant dans des directions aléatoires de s'orienter ? Nous avons développé l'approche suivante avec Mike Cates, de la School of Physics and Astronomy de l'université d'Edinburgh, pour répondre à ces questions. Il s'agit de calculer l'énergie d'une assemblée de N grains sous champ. Ce calcul est faisable relativement simplement dans les cas $B < 13$ mT ($\xi < 1$) et $B > 26$ mT ($\xi > \sigma$).

Considérons un grain dans l'assemblée. Immédiatement après l'application d'un champ, son axe de facile aimantation fait un angle θ avec B (FIGURE 2.9).

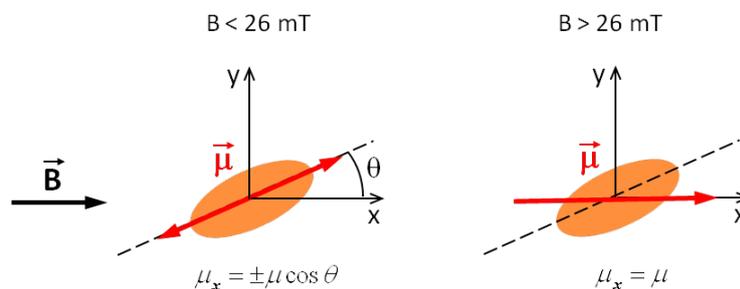


FIGURE 2.9 – Orientation du moment magnétique d'un grain dans une bille selon la valeur du champ magnétique.

Si $B < 13$ mT ($\xi < 1$) : c'est dans cette gamme de champ que l'anisotropie optique varie très fortement (FIGURE 2.8). C'est donc le régime important pour déterminer le couplage de la bille avec le

champ. On rappelle que dans ce régime le moment magnétique μ est rigidement lié à son axe mais est libre de basculer dans l'une ou l'autre de ses directions. Sa projection μ_x selon le champ magnétique ne peut prendre que 2 valeurs : $\pm\mu \cos\theta$. La valeur moyenne de μ_x est donc :

$$\langle \mu_x \rangle = \frac{\mu \cos\theta e^{\xi \cos\theta} - \mu \cos\theta e^{-\xi \cos\theta}}{e^{\xi \cos\theta} + e^{-\xi \cos\theta}} = \mu \cos\theta \tanh\left(\frac{\mu B}{k_B T} \cos\theta\right) \quad (2.19)$$

Soit, après linéarisation de la tangente hyperbolique : $\langle \mu_x \rangle \sim \frac{\mu^2 B}{k_B T} \cos^2\theta$. L'énergie de la bille vaut :

$$U = -\frac{\mu^2 B^2}{k_B T} \sum_{i=1}^N \cos^2\theta_i \quad (2.20)$$

Par analogie avec une marche aléatoire, on conçoit qu'il existe une direction φ dans laquelle la somme ci-dessus est maximale et vaut $\sqrt{N} \cos^2\varphi$ à un facteur géométrique près [Usov et al., 2007]. On peut alors récrire l'expression de l'énergie :

$$U(\varphi) \propto -\frac{\sqrt{N} \mu^2 B^2}{k_B T} \cos^2\varphi \quad (2.21)$$

Le couple appliqué à la bille $\frac{\partial U}{\partial \varphi}$ tend à orienter la bille dans la direction φ de son minimum d'énergie.

Si $B > 26$ mT ($\xi > \sigma$) : ce cas est moins pertinent puisqu'à cette valeur de champ, les billes ont déjà atteint leur Δn_{sat} . Les moments magnétiques des grains s'orientent indépendamment de la direction de leur axe de facile aimantation. La valeur moyenne de μ_x est alors : $\langle \mu_x \rangle = \mu \mathcal{L}(\xi)$. L'énergie vaut maintenant :

$$U \propto -\sqrt{N} \mu \sigma \cos^2\varphi \quad (2.22)$$

U est maintenant indépendante de B . Le couple de rappel élastique lié à l'anisotropie magnétique de chaque grain maintient la bille dans la direction de son minimum d'énergie.

Il est possible d'obtenir une expression numérique de l'anisotropie obtenue avec l'expression de l'énergie (2.21) en utilisant la relation (1.11). Elle est tracée sur la FIGURE 2.10 avec les paramètres correspondants aux billes de 240 nm. Même en augmentant dramatiquement le nombre de grains dans la bille, on ne peut pas ajuster correctement la courbe expérimentale. Le modèle de l'assemblée aléatoire de grains ne génère pas un couplage assez grand à bas champ pour expliquer le comportement observé car un trop grand nombre de grains voient leur moment continuer de basculer dans cette gamme de champ.

Cette observation conduit à se demander si le comportement des billes magnétiques sous champ ne pourrait pas être assimilable à celui d'un dipôle permanent (rigide ou non) qui présente l'avantage d'avoir

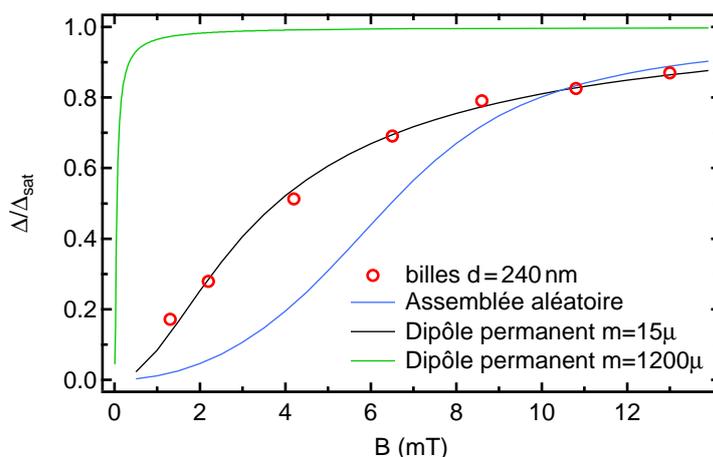


FIGURE 2.10 – Modélisation de l’anisotropie optique à l’équilibre d’une bille de 240 nm pour $\xi < 1$. Pour le modèle assemblée aléatoire, les paramètres utilisés sont : $N = 1200$ et $\mu = 3 \cdot 10^{-19} \text{ A m}^2$ (correspondant au moment magnétique moyen d’un grain de ferrofluide).

une anisotropie plus grande. Son couplage avec le champ serait alors plus élevé. Le moment magnétique de ce dipôle pourrait simplement être la somme des moments de tous les grains que la bille contient. Pour tester cette hypothèse, on trace sur la FIGURE 2.10 la fonction \mathcal{L}_2 de Langevin décrivant l’anisotropie optique d’un dipôle permanent de moment $m = 1200 \mu_{\text{grain}}$, où μ_{grain} est le moment magnétique moyen d’un grain de ferrofluide calculé au chapitre précédent. Cette courbe ne correspond absolument pas à la courbe expérimentale car elle prévoit un couplage trop grand à bas champ.

La courbe expérimentale est alors ajustée par une fonction \mathcal{L}_2 avec comme paramètre le moment magnétique m (FIGURE 2.10). L’ajustement est très bon, et donne une valeur de $m = 15 \mu_{\text{grain}}$. Cette valeur correspond au moment d’un grain de 30 nm de diamètre. A cette taille, le temps de Néel vaut 10^6 s et l’anisotropie magnétique vaut $\sigma = 35$. La valeur de m est faible devant le moment magnétique à saturation de la bille (qui vaut $1200 \mu_{\text{grain}}$) et ne perturbe donc pas son comportement à champ fort. L’anisotropie de ce gros grain suffit pourtant pour dominer le couplage de la bille à bas champ.

En résumé, le couplage calculé par le modèle de l’assemblée aléatoire de grains n’est pas assez fort pour expliquer les résultats expérimentaux. L’orientation des billes de 240 nm à l’équilibre sous champ est donc dominé, au moins pour $\xi < 1$, par la présence d’un dipôle permanent dans les billes pouvant correspondre à un gros grain. Voyons maintenant si ce résultat est vérifié quand le nombre de grains dans les billes est modifié.

2.5 Évolution avec le nombre de grains

On s'intéresse maintenant à l'évolution de Δ avec B en fonction du type de billes (FIGURE 2.11). Pour pouvoir comparer des courbes qui n'ont pas la même valeur au plateau, les courbes sont normalisées par Δ_{sat} . Il est clair que lorsque la taille augmente, la saturation est atteinte plus rapidement. On a porté sur ce graphe la courbe correspondant au ferrofluide. L'échelle d'évolution de Δ est complètement différente : alors qu'à 20 mT, le plateau est atteint pour toutes les billes, les grains en suspension dans le ferrofluide ne sont encore que faiblement orientés. Il faut dépasser 300 mT pour qu'ils atteignent la saturation.

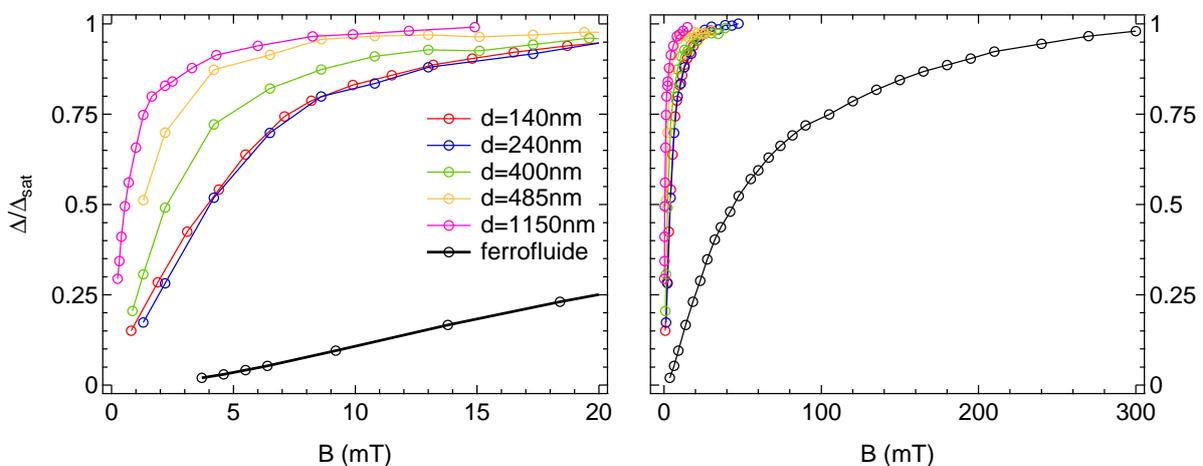


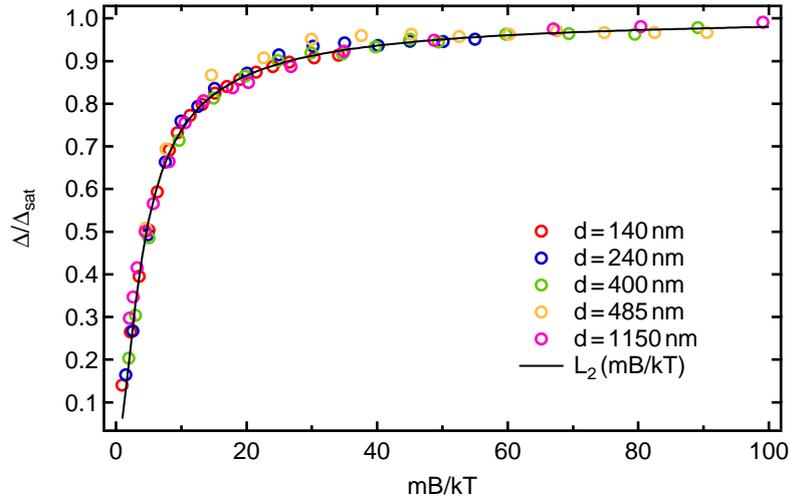
FIGURE 2.11 – Évolution de $\Delta/\Delta_{\text{sat}}$ à deux échelles de champ magnétique : celle des billes (*gauche*), et celle du ferrofluide (*droite*).

La fonction \mathcal{L}_2 de Langevin permet un bon ajustement de la courbe $\Delta(B)$ pour toutes les billes étudiées. Le moment magnétique permanent m ainsi déduit permet de renormaliser toutes les courbes sur une même courbe maîtresse (FIGURE 2.12).

Ce paramètre, exprimé en multiple du moment moyen d'un grain, est donné dans la TABLE 2.2. Pour évaluer son ordre de grandeur, on a également calculé le diamètre équivalent d'un unique grain qui posséderait le même moment magnétique.

La connaissance de la distribution de taille du ferrofluide ayant servi à fabriquer les billes permet de calculer la probabilité de trouver au moins un tel grain parmi les N que compte la bille. Cette probabilité est également donnée dans la TABLE 2.2. Insistons sur le fait que cette valeur est extrêmement sensible aux paramètres de la distribution de taille. De plus, comme on l'a vu au chapitre précédent, le ferrofluide compte plus de gros objets que ne le prévoit la distribution log-normale. Il faut donc interpréter les valeurs données comme des ordres de grandeur.

Néanmoins, on peut conclure qu'il est très probable de trouver un grain assez gros dans les billes

FIGURE 2.12 – Normalisation des courbes $\Delta(B)$ grâce à un moment magnétique permanent m .

Particules	Moment magnétique permanent (unités μ_{grain})	Diamètre de grain correspondant	Probabilité d'avoir un grain
Grains de ferrofluide	1	13 nm	-
Billes de 140 nm	15	30 nm	35%
Billes de 240 nm	15	30 nm	93%
Billes de 400 nm	31	40 nm	4%
Billes de 490 nm	47	47 nm	0.3%
Billes de 1150 nm	120	65 nm	0.001%

TABLE 2.2 – Comparaison du moment magnétique permanent des particules étudiées. La probabilité de trouver au moins un grain de la taille correspondante dans la bille est calculée d'après la distribution de taille log-normale du ferrofluide dont les paramètres sont $d_0 = 13.6$ nm et $s = 0.25$.

de 140 nm et 240 nm pour expliquer leur moment permanent. En revanche, pour les billes de taille supérieure, l'hypothèse n'est pas raisonnable et il faut envisager l'existence de plusieurs gros grain pour expliquer le moment permanent total.

Lorsqu'on trace l'évolution du moment magnétique permanent avec le nombre de grains total dans la bille (FIGURE 2.13), on s'aperçoit qu'elle est bien décrite par la fonction :

$$m = 0.55 \sqrt{N} \mu_{\text{grain}} \quad (2.23)$$

Pour mieux comprendre l'origine du moment permanent dans les billes, il aurait plutôt fallu tracer m en fonction du nombre N_p de grains de diamètre supérieur à 30 nm dans la bille. On n'a malheureusement pas accès à N_p , mais on sait qu'il est proportionnel à N . On déduit donc de la FIGURE 2.13 : $m \propto \sqrt{N_p}$.

Cette simple expression contient un résultat important. Elle indique que le moment permanent des

billes varie bien avec le nombre de gros grains N_p qu'elle contient. Ces grains étant orientés aléatoirement dans la bille, le moment magnétique résultant est proportionnel à $\sqrt{N_p}$.

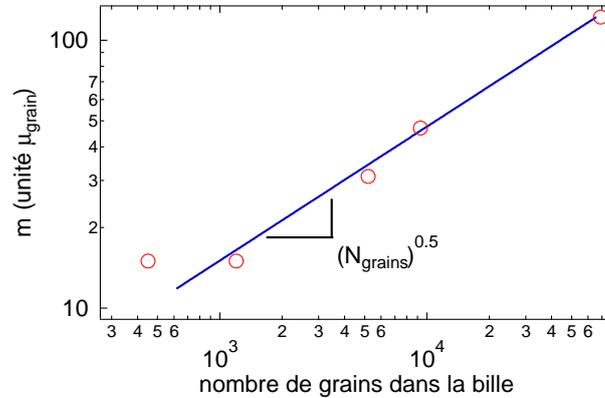


FIGURE 2.13 – Moment permanent m des billes (exprimé en multiple de μ_{grain}) en fonction du nombre de grains total ajusté par l'expression $0.55 \sqrt{N} \mu_{\text{grain}}$.

En résumé, l'examen du comportement des billes à l'équilibre dans un champ magnétique nous a permis d'établir que leur couplage avec ce champ ne pouvait pas être expliqué par un modèle de type assemblée aléatoire. L'hypothèse de quelques gros grains dominant ce couplage est tout à fait raisonnable compte tenu de la polydispersité mesurée du ferrofluide. Ce comportement est généralisable quelque soit le diamètre des billes considéré, le moment permanent mesuré augmentant de façon cohérente avec le nombre de grains dans la bille. Nous allons maintenant voir si le couplage que nous avons décrit à l'équilibre est cohérent avec le couple mesuré lors du régime transitoire pendant lequel les billes tournent sur elles-mêmes pour atteindre l'équilibre.

2.6 Dynamique des billes

Il s'agit dans cette section de décrire le comportement hors équilibre des billes. On observe donc la façon dont les billes relaxent pour s'orienter à l'établissement de B et pour se désorienter à la coupure de B . Rappelons tout d'abord que le temps de montée et de descente du courant dans les bobines qui servent à appliquer le champ est inférieur à 5 ms. Il n'est donc pas limitant pour le temps de rotation des billes qui est au minimum 10 fois plus lent.

2.6.1 Normalisation par la viscosité

L'étude de la dynamique à différentes viscosités permet de confirmer que l'effet d'anisotropie optique observé est bien un effet de la rotation des billes. On prépare pour cela plusieurs échantillons de

billes de 240 nm à des concentrations différentes en glycérol. Leur viscosité est mesurée en DLS selon la technique décrite au paragraphe 2.2.2.

Quel que soit le mécanisme par lequel les billes relaxent, le couple visqueux s'oppose toujours à la rotation. Si la vitesse de relaxation de l'anisotropie optique est liée à la vitesse de rotation des billes, on s'attend donc à ce qu'elle soit inversement proportionnelle à la viscosité. Sur la FIGURE 2.14 est représentée la relaxation de Δ à champ magnétique constant égal à 8 mT en fonction du temps réel, puis du temps normé par $\frac{\eta_{\text{eau}}}{\eta}d$. Grâce à ce facteur de normalisation, les courbes de relaxation se superposent sur une même courbe maîtresse, à la fois à l'établissement et à la coupure du champ.

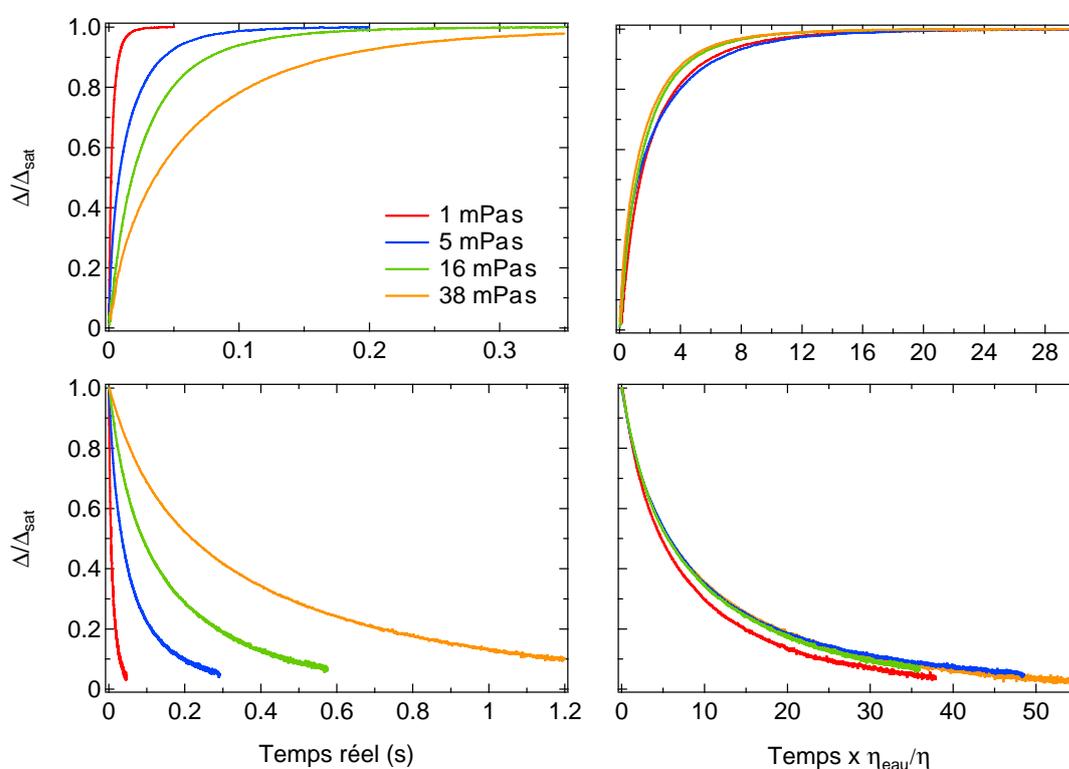


FIGURE 2.14 – Dynamique de l'anisotropie optique à l'établissement (*haut*) et à la coupure (*bas*) d'un champ magnétique de 8 mT pour les billes de 240 nm à différentes viscosités.

2.6.2 Coupure du champ

Pour appréhender le mécanisme par lequel les billes relaxent, on étudie maintenant leur dynamique dans un échantillon à 80% de glycérol lorsque l'on fait varier le champ magnétique.

Quand le champ est coupé les billes ne sont plus soumises à aucun couplage. Elles se désorientent donc grâce à l'agitation thermique et ce à la même vitesse, quelle que soit l'intensité du champ appliqué avant. La relaxation de l'anisotropie optique est donc exponentielle, avec un temps caractéristique $\tau_{\text{rot}} =$

$\frac{1}{6D_r}$ [Perrin, 1934]. Dans le cas des billes de 1150 nm (FIGURE 2.15), l'ajustement par une exponentielle donne un temps caractéristique de 14 s, soit une viscosité de 70 mPa s.

Il n'a pas été possible de mesurer la viscosité de cet échantillon en DLS, le diamètre apparent sortant de la gamme de mesure de l'appareil. La viscosité tabulée d'une solution aqueuse à 80% de glycérol à 20°C est 60 mPa s. A une telle teneur en glycérol, la viscosité varie beaucoup avec de faibles écart de température et de concentration. La valeur obtenue est donc en bon accord avec les tables.

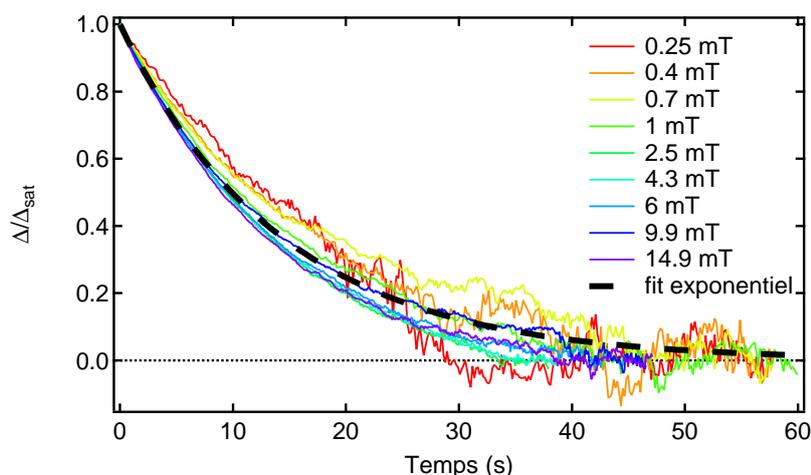


FIGURE 2.15 – Relaxation de l'anisotropie optique à la coupure du champ pour les billes de 1150 nm. Le faisceau de courbes est ajusté par une exponentielle de temps caractéristique 14 s.

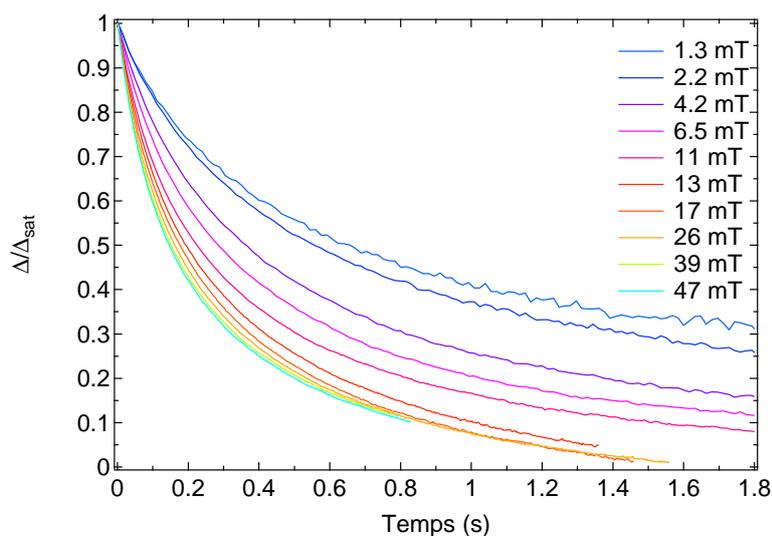


FIGURE 2.16 – Relaxation de l'anisotropie optique à la coupure du champ pour les billes de 240 nm. A cause de la polydispersité des billes, les courbes ne se superposent plus et la relaxation n'est pas monoexponentielle.

L'échantillon de billes de 1150 nm est le plus monodisperse de ceux étudiés. Dans les autres échantillons, les effets de polydispersité introduisent une dépendance du temps de relaxation observé avec le champ magnétique, comme l'illustre la FIGURE 2.16. A faible champ, les gros objets sont significativement plus orientés que les petits, du fait de leur moment magnétique plus grand. D'où un temps de relaxation observé artificiellement long à faible champ. Ce temps diminue quand B augmente, à mesure que la majorité des particules s'ordonnent à leur tour.

2.6.3 Établissement du champ

A l'établissement de B , le couplage magnétique des billes provoque un mouvement de rotation et l'anisotropie optique augmente jusqu'à ce que les billes soient orientées. La relaxation observée est le résultat de la compétition entre le couple magnétique, la dissipation visqueuse et l'agitation thermique (FIGURE 2.17). La dynamique d'un grain de ferrofluide en solution décrite au paragraphe 1.6 peut dans une certaine mesure être extrapolée à celle d'une bille. A faible champ, l'agitation thermique dicte le mouvement des billes qui s'orientent avec une vitesse indépendante de B . Passé un certain seuil, le couple magnétique devient dominant et l'orientation est de plus en plus rapide.

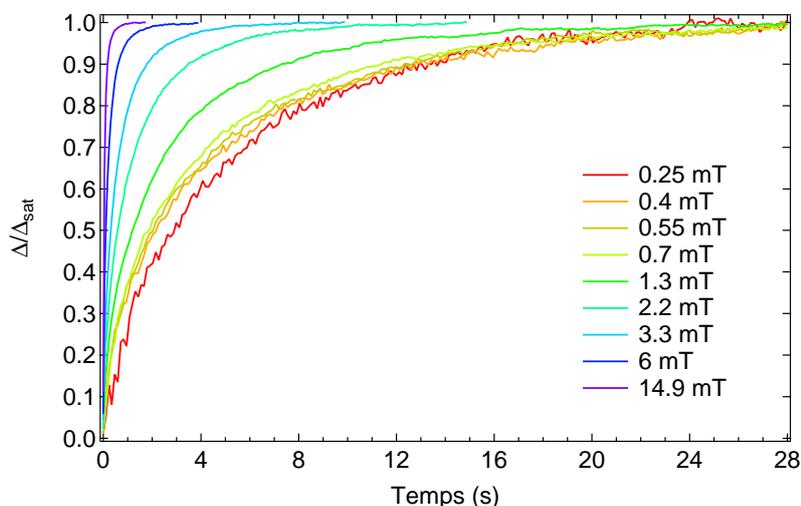


FIGURE 2.17 – Relaxation de l'anisotropie optique à l'établissement du champ pour les billes de 1150 nm.

La relaxation de l'anisotropie optique n'est pas une monoexponentielle mais une série infinie d'exponentielles [Raikher et al., 2002], qui résulte de la résolution de l'équation différentielle de Fokker-Plank décrivant le mouvement d'orientation. Dans le cas d'un seul grain, $U_{\text{mag}} \sim k_B T$ et la série peut être approximée par son premier terme. Mais pour une bille, U_{mag} devient rapidement très grand devant $k_B T$ et il faut prendre en compte un grand nombre de termes.

La vitesse d'orientation de la bille ne sature pas quand on dépasse l'énergie d'anisotropie d'un

grain, contrairement à ce qui se passe avec le ferrofluide. Des mesures jusqu'à 100 mT dans un tampon à 95% de glycérol ne nous ont pas permis d'observer de saturation. Cela est cohérent avec l'existence de plusieurs gros grains, dont l'énergie d'anisotropie est grande, qui dominent le couplage de la bille avec le champ.

Il est possible de résoudre numériquement l'équation de Fokker-Plank pour un moment permanent correspondant à celui d'une bille. On trouve une vitesse plus lente que celle observée, notamment à temps court : le modèle prévoit une tangente à l'origine horizontale, ce qui traduit le fait que le temps de Néel τ_N des gros grains est trop grand pour leur permettre de réagir rapidement au champ. Pour expliquer la rapidité du mouvement, il faut prendre en compte l'influence des petits grains dont τ_N est plus faible. Ces grains sont modélisés simplement par un dipôle induit superposé au dipôle permanent. Mais la contribution respective des gros et des petits grains est difficile à discerner et rend compliquée la modélisation qui ne s'avère pas satisfaisante.

Pour néanmoins rendre compte de la dynamique de l'établissement de l'anisotropie optique, on choisit de mesurer un temps de montée $\tau_{90\%}$ que l'on définit arbitrairement comme le temps nécessaire à Δ pour atteindre 90% de sa valeur à saturation. La FIGURE 2.18 représente $\tau_{90\%}$ en fonction du champ magnétique pour les billes de 1150 nm. Deux régimes asymptotiques ont été mis en valeur : (i) à faible champ, le temps de montée est constant et sensiblement égal au temps de relaxation brownienne ; (ii) à fort champ le temps de montée varie comme $\frac{1}{B^{1.5}}$. Ce comportement à fort champ est assez bien reproductible pour tous les diamètres des billes. Il illustre la difficulté de séparer la contribution des gros grains de celle de l'assemblée des petits grains. En effet, pour un dipôle on attend $\tau_{90\%} \sim \frac{1}{B}$ (cf. FIGURE 1.11). Pour l'assemblée de petits grains, on attend d'après l'expression (2.21) de l'énergie : $\tau_{90\%} \sim \frac{1}{U} \sim \frac{1}{B^2}$.

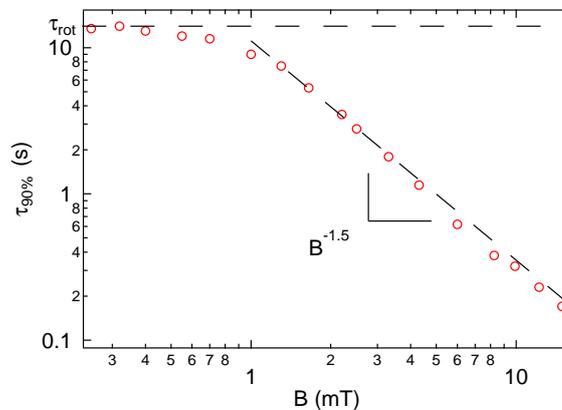


FIGURE 2.18 – Évolution avec le champ magnétique du temps de montée de l'anisotropie optique des billes de 1150 nm.

2.7 Comparaison avec la littérature

La plupart des auteurs qui utilisent les propriétés de couplage des billes magnétiques s'en servent comme un outil pour mesurer les propriétés de molécules biologiques [Strick et al., 1996; Hu et al., 2004; Janssen et al., 2011]. Leur priorité n'est donc pas d'élucider l'origine de ce couplage. Si l'existence d'un moment permanent dans les billes est très fortement suspecté par tous, à notre connaissance seules deux études quantifient ce moment : Shevkopyas et al. [2007] et Janssen et al. [2009], dont la démarche a été reprise dans le même groupe par Ranzoni et al. [2010].

Shevkopyas et al. [2007] observent que le mouvement de billes magnétiques dans un gradient de champ est plus rapide que le modèle classique du dipôle induit ne le prévoit. L'ajout d'une composante permanente au moment magnétique dans le calcul de la vitesse permet de prédire correctement le mouvement. Mais l'origine de cette composante permanente n'est pas discutée. Il se pourrait très bien qu'un modèle de type assemblée aléatoire soit suffisant pour décrire le comportement observé.

En mesurant la fréquence de rotation f_{bille} d'une bille dans un champ magnétique tournant à la fréquence f_{champ} , Janssen et al. [2009] excluent la possibilité d'un couplage dû uniquement à l'assemblée aléatoire. En effet, Ils observent que lorsque $f_{\text{champ}} > 10$ Hz, les billes sont capables de tourner dans le sens inverse du champ. Cela n'est possible que si quelques grains dans la bille ont un τ_N suffisamment grand pour introduire un retard de phase supérieur à π . Pour $f_{\text{champ}} > 400$ kHz, les auteurs remarquent que f_{bille} diminue progressivement. Ce résultat est interprété comme l'effet de la polydispersité des grains : à une fréquence f_{champ} donnée, seule la fraction de grains dont $\tau_N < 1/f$ sont capables de suivre le champ appliqué.

Nous apportons ici une preuve supplémentaire de l'existence d'un moment permanent dans des billes magnétiques que nous avons quantifié. Notre approche basée sur une méthode optique permet d'obtenir une très bonne statistique sur cette mesure puisque chacune de nos expériences sonde plus de 10^5 billes. Ce moyennage sur un grand nombre d'objets est primordial étant donné la variabilité reconnue des propriétés magnétiques d'une bille à l'autre [van Ommering et al., 2006]. A titre de comparaison, les mesures de Janssen et al. [2009] et Ranzoni et al. [2010] sont réalisées sur des billes uniques et celles de Shevkopyas et al. [2007] sur quelques dizaines de billes.

L'étude préalable du ferrofluide ayant servi à fabriquer les billes sur lesquelles nos mesures sont réalisées justifie l'existence de quelques gros grains dans les billes dont l'anisotropie est suffisamment grande pour expliquer le couplage observé. Leur nombre ainsi que leur diamètre sont cohérents avec la distribution de taille du ferrofluide. La présence ou non de ces gros grains dans une bille isolée d'une large population est un phénomène statistique. En quantifiant la distribution de taille des grains, nous

justifions la grande variabilité du moment permanent observé d'une bille à l'autre par Janssen et al. [2009] et Ranzoni et al. [2010].

Les mesures réalisées sur des billes de plusieurs tailles fabriquées par des procédés différents nous ont permis de dégager un modèle universel d'évolution du moment permanent en fonction du nombre de grains total de la forme $m \propto \sqrt{N}$. Cela équivaut à ce qu'une fraction de gros grains orientés aléatoirement soit responsable du moment permanent.

Il est intéressant de remarquer que Ranzoni et al. [2010] utilisent des billes de 1 μm fournies par Dynal et donc quasiment identiques aux billes de 1150 nm que nous avons utilisées. Le moment permanent qu'ils calculent vaut avec nos unités : $m_{\text{perm}} \sim 500 \mu_{\text{grain}}$, soit 4 fois plus que ce que nous avons mesuré. La mesure de Ranzoni et al. [2010] est faite sur des billes seules. Cette technique peut conduire à surestimer le moment permanent en choisissant systématiquement d'analyser des billes qui "tournent bien" donc présentent un grand moment permanent.

Janssen et al. [2009] utilisent aussi des billes fournies par Dynal, mais de 2.8 μm . On peut donc les confronter au modèle que nous avons développé. Dynal donne une densité de 1.4 pour ces billes, soit un nombre approximatif de grains de 10^6 . On calcule donc $m_{\text{perm}} \sim 1000 \mu_{\text{grain}}$, alors que la valeur trouvée par les auteurs vaut 8000 μ_{grain} . L'ordre de grandeur est relativement correct.

Les mesures que nous avons effectuées hors équilibre confirment le couplage existant entre les billes et le champ. La vitesse avec laquelle les billes tournent pour s'orienter augmente avec leur taille et avec la valeur du champ, ce qui est cohérent avec les mesures à l'équilibre. En revanche le comportement n'est pas aussi nettement dominé par le moment permanent. Plutôt que de dissocier l'influence des gros grains et celle de l'assemblée aléatoire de petits grains, un modèle prenant en compte la contribution de tous les grains dans la bille en fonction de leur taille permettrait certainement d'expliquer le couplage observé mais n'est pas l'objectif premier de ce travail.

Conclusion sur les propriétés magnétiques des billes

Nous avons montré dans cette partie comment le couplage d'un grain superparamagnétique avec un champ peut être transposé à l'échelle d'une bille magnétique et explique l'existence d'un couplage magnétique mésoscopique dans cette bille.

Nous avons commencé pour cela par la description bibliographique approfondie du couplage magnétique existant au sein des grains de ferrofluide et qui provoque leur orientation dans un champ externe. Il a été mis en évidence que ce couplage est extrêmement sensible à la taille des grains. De plus, nous avons exposé la technique expérimentale basée sur la mesure de l'anisotropie optique qui permet de quantifier la façon dont ces grains s'orientent.

Nous avons effectué une étude complète des propriétés magnétiques de billes de taille différente, après avoir caractérisé le ferrofluide qui a servi à les fabriquer.

Cette caractérisation a été réalisée en utilisant la mesure d'anisotropie optique, dont nous avons montré, au moyen d'une mesure de DDLS, qu'elle était transposable aux billes magnétiques. Nous avons fait évoluer le dispositif expérimental décrit dans la littérature pour l'adapter aux contraintes propres aux billes et s'affranchir du phénomène de chaînage.

Le couplage magnétique des billes a été envisagé à la lumière de deux modèles. Dans le premier, le couplage est expliqué par l'assemblée aléatoire de petits grains de la bille mais se révèle trop faible pour expliquer les résultats expérimentaux. Un second modèle montre que le couplage est dominé par la présence d'un moment permanent dans les billes correspondant à quelques gros grains dont la présence dans les billes est cohérente avec la polydispersité du ferrofluide. La robustesse de ce modèle tient à ce qu'il est généralisable à des billes magnétiques de différente taille.

Enfin, des mesures de la rotation des billes hors équilibre confirment l'existence du couplage

magnétique. Les temps de rotation observés sont cohérents avec le mouvement de billes isolées. Mais elles mettent en évidence le besoin d'un modèle prenant en compte la contribution de tous les grains dans la bille en fonction de leur taille pour expliquer complètement le couplage observé, surtout à temps court.

La technique expérimentale développée pour comprendre le couplage magnétique des billes dans un champ constitue un nouveau moyen de caractérisation puissant. Il permet d'envisager le développement de nouvelles particules aux propriétés adaptées à l'application visée en changeant la distribution de taille du ferrofluide utilisé pour les fabriquer. Une distribution large permettrait aux billes de présenter un couplage fort avec le champ, que l'on pourrait mesurer précisément. De tels objets seraient bien adaptés aux expériences de pinces magnétiques. Au contraire, une distribution serrée permettrait aux billes de tourner librement sous champ, ce que l'on pourrait vérifier dans notre montage, et améliorerait la réactivité des tests de diagnostic immunologique.

Synthèse de billes magnétiques

La synthèse de billes magnétiques repose sur l'émulsification dans l'eau d'un ferrofluide organique puis l'application d'un cisaillement contrôlé afin d'obtenir des gouttelettes d'émulsion de taille calibrée. Ce cisaillement peut être appliqué entre deux plaques dans un émulsifieur de type Couette [Mason and Bibette, 1996]. Dans cette annexe est présentée une approche différente utilisant le cisaillement créé par une sonde à ultrasons.

Pour obtenir des billes de 200 nm de diamètre environ, on prépare une solution contenant 15% vol/vol de ferrofluide et 10% en masse de SDS dans l'eau MilliQ, pour un volume total de 35 mL environ. L'augmentation de la concentration en ferrofluide et en SDS aboutit à la fabrication de billes plus petites.

Les ultrasons sont appliqués par périodes de 5 s, suivies de 10 s de repos pour éviter de trop chauffer la solution. Toutes les 2 min, la taille des gouttelettes d'émulsion ainsi obtenues est contrôlée en DLS. Au bout de 8 min d'application d'ultrasons, la taille mesurée en DLS n'évolue plus.

L'émulsion de ferrofluide est ensuite traitée pour être rendue la plus monodisperse possible selon la méthode de cristallisation fractionnée décrite par [Bibette, 1991].

Anisotropie optique d'une suspension de billes magnétiques

Il s'agit ici de montrer que les échantillons de billes magnétiques que nous avons étudiés sont identifiables à des lames homogènes optiquement anisotropes de même épaisseur. On s'appuiera pour cela sur les calculs de diffusion de la lumière par des particules anisotropes de van de Hulst [1957] et sur le calcul de transmission de la lumière à travers une lame homogène de Bohren and Huffman [1983].

Diffusion par une particule

Considérons tout d'abord une particule diffusante éclairée par une onde électromagnétique plane $u_0 = e^{ik_1z - i\omega t}$ se propageant dans la direction $z > 0$ (FIGURE B.1) dans un milieu d'indice optique \tilde{n}_1 . Dans cette expression, $k_1 = \frac{2\pi\tilde{n}_1}{\lambda}$ est la fréquence spatiale et ω la pulsation temporelle.

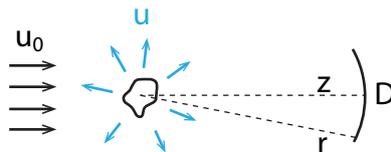


FIGURE B.1 – Diffusion de la lumière par une particule mesurée par un détecteur D.

L'amplitude diffusée par la particule est une onde sphérique qui a pour expression à une distance

r de la particule située dans une direction (θ, φ) définie par rapport à l'axe z :

$$u = S(\theta, \varphi) \frac{e^{ik_1 r - i\omega t}}{ik_1 r} = S(\theta, \varphi) \frac{e^{ik_1(r-z)}}{ik_1 r} u_0 \quad (\text{B.1})$$

Cette expression définit la fonction amplitude $S(\theta, \varphi)$ diffusée par la particule. Elle est définie par continuité en $\theta = 0$ et $\varphi = 0$. $S(\theta, \varphi)$ est généralement complexe.

Calculons à présent l'intensité lumineuse transmise par ce système, c'est à dire l'intensité lumineuse mesurée par un détecteur sphérique D situé sur l'axe z (FIGURE C.1) et dont l'extension spatiale est négligeable devant z .

L'onde arrivant en un point r du détecteur peut s'écrire :

$$u_0 + u(r) = u_0 \left(1 + \frac{S(0)}{ik_1 r} e^{ik_1(r-z)} \right) \quad (\text{B.2})$$

Par intégration de l'intensité lumineuse sur la surface du détecteur, on obtient une expression de la forme :

$$I = \int dr |u_0 + u(r)|^2 = I_0 - C_{\text{ext}} \quad (\text{B.3})$$

Tout se passe comme si une partie de l'intensité lumineuse I_0 provenant de la source était bloquée par une certaine section efficace d'extinction C_{ext} . Le calcul développé précédemment montre que cette perte d'intensité correspond à un phénomène d'interférence plus subtil. Le calcul exact de l'intégrale donne pour expression de C_{ext} :

$$C_{\text{ext}} = \frac{4\pi}{k_1^2} \text{Re}\{S(0)\} \quad (\text{B.4})$$

Cas d'une suspension de sphères anisotropes

La fonction amplitude $S(\theta, \varphi)$ d'une particule optiquement anisotrope prend une forme matricielle. Pour obtenir un équivalent de l'expression (B.1), on décompose l'onde incidente en une composante parallèle à l'axe d'anisotropie optique de la particule (aussi appelé axe rapide) et une composante dans une direction perpendiculaire à cet axe (aussi appelée axe lent) :

$$\begin{pmatrix} E_t^{\parallel} \\ E_t^{\perp} \end{pmatrix} = \frac{e^{ik_1(r-z)}}{ik_1 r} \begin{pmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_0^{\parallel} \\ E_0^{\perp} \end{pmatrix} \quad (\text{B.5})$$

Dans le cas d'une particule sphérique, $S_3 = S_4 = 0$ par symétrie.

Calculons maintenant l'onde transmise par une suspension contenant ρ sphères anisotropes par

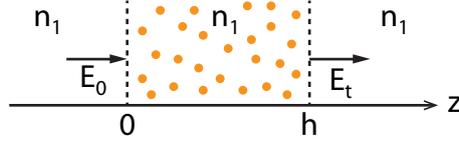


FIGURE B.2 – Propagation de la lumière à travers une suspension de particules optiquement anisotropes.

unité de volume plongées dans un milieu d'indice réel $\tilde{n}_1 = n_1$ (FIGURE B.2). Si ρ est suffisamment petit, les effets de diffusion multiple sont négligeables, et on peut sommer l'expression (B.5) sur toutes les particules. On obtient :

$$\begin{pmatrix} E_t^{\parallel} \\ E_t^{\perp} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 - q \langle S_2(0) \rangle & 0 \\ 0 & 1 - q \langle S_1(0) \rangle \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_0^{\parallel} \\ E_0^{\perp} \end{pmatrix} \quad \text{avec} \quad q = \frac{2\pi}{k_1^2} \rho h \quad (\text{B.6})$$

où les quantités $\langle S_1(0) \rangle$ et $\langle S_2(0) \rangle$ sont des moyennes réalisées sur l'ensemble de la distribution d'orientation des particules.

Cas d'une lame homogène anisotrope

On considère à présent la propagation d'une onde à travers une lame homogène optiquement anisotrope (FIGURE B.3).

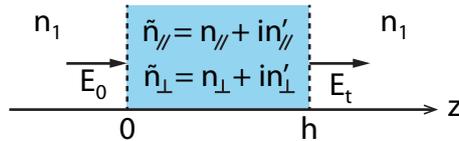


FIGURE B.3 – Propagation de la lumière à travers une lame homogène anisotrope.

La lame a une épaisseur h et un indice optique $\tilde{n}_{\parallel} = n_{\parallel} + in'_{\parallel}$ selon son axe rapide et $\tilde{n}_{\perp} = n_{\perp} + in'_{\perp}$ selon son axe lent. Elle est plongée dans un milieu d'indice réel $\tilde{n}_1 = n_1$. On se situe donc dans les mêmes conditions que pour la suspension de particules à la section précédente. On définit des coefficients de transmission complexes \tilde{t}_{\parallel} et \tilde{t}_{\perp} tels que :

$$\begin{pmatrix} E_t^{\parallel} \\ E_t^{\perp} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \tilde{t}_{\parallel} E_0^{\parallel} \\ \tilde{t}_{\perp} E_0^{\perp} \end{pmatrix} \quad (\text{B.7})$$

Les conditions de continuité de la composante tangentielle des champs électrique et magnétique imposées par les équations de Maxwell aux interfaces permettent de calculer les coefficients de transmission. En posant $j = //, \perp$ on a :

$$\tilde{t}_j = \frac{4m}{(1+m)^2} \frac{e^{-ik_j h}}{e^{-ik_1 h} - r^2 e^{ik_1 h}} \quad \text{avec} \quad m = \frac{n_1}{\tilde{n}_j}; \quad k_j = \frac{2\pi\tilde{n}_j}{\lambda} \quad \text{et} \quad r = \frac{1-m}{1+m} \quad (\text{B.8})$$

En faisant l'hypothèse que $|\tilde{n}_j| \sim n_1$, donc $m \sim 1$ et $r \sim 0$ l'expression se simplifie en :

$$\tilde{t}_j = e^{-i(k_j - k_1)h} \sim 1 - i(k_j - k_1)h \quad j = //, \perp \quad (\text{B.9})$$

Et finalement :

$$\begin{pmatrix} E_t^// \\ E_t^\perp \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \left(1 - i\frac{2\pi}{\lambda}(\tilde{n}_// - n_1)h\right) E_0^// \\ \left(1 - i\frac{2\pi}{\lambda}(\tilde{n}_\perp - n_1)h\right) E_0^\perp \end{pmatrix} \quad (\text{B.10})$$

Identification

Par identification de l'onde transmise par la suspension de particules anisotropes et par la lame homogène, c'est à dire identification des expression (B.7) et (B.10), on obtient :

$$\begin{aligned} \tilde{n}_// &= n_1 \left(1 - i\frac{2\pi}{k_1^3} \rho \langle S_2(0) \rangle\right) \\ \tilde{n}_\perp &= n_1 \left(1 - i\frac{2\pi}{k_1^3} \rho \langle S_1(0) \rangle\right) \end{aligned} \quad (\text{B.11})$$

De sorte que l'anisotropie optique de la suspension vaut :

$$\tilde{n}_// - \tilde{n}_\perp = i\frac{2\pi}{k_1^3} \rho [\langle S_1(0) \rangle - \langle S_2(0) \rangle] \quad (\text{B.12})$$

On a donc bien montré que la suspension de particules anisotropes est assimilable à une lame homogène dont l'anisotropie optique est proportionnelle au nombre de particules présentes. Ceci n'est vrai qu'en transmission, et ne serait pas vérifié en réflexion par exemple.

Cas de particules petites devant la longueur d'onde

Pour des particules petites devant la longueur d'onde, comme les grains de ferrofluide, une expression de $S_1(0)$ et $S_2(0)$ peut être calculée. Dans ce régime dit de Rayleigh, on considère les particules comme des dipôles électriques induits \vec{p} dont l'interaction avec l'onde lumineuse est définie via la polari-

sabilité α tel que $\vec{p} = \alpha \varepsilon \vec{E}_0$. La polarisabilité est une grandeur complexe, et dépend du volume. On définit une grandeur adimensionnée : la susceptibilité électrique χ^{el} telle que $\alpha = V_p \chi^{el}$ où V_p est le volume d'une particule.

Dans le cas de particules isotropes, $S_1(0) = S_2(0) = \frac{ik_1^3 V_p \chi^{el}}{4\pi}$. Pour des particules anisotropes, la polarisabilité vaut $\alpha_{//} = V_p \chi_{//}^{el}$ dans la direction de l'axe rapide et $\alpha_{\perp} = V_p \chi_{\perp}^{el}$ dans la direction de l'axe lent. De sorte que $S_1(0) = \frac{ik_1^3 V_p \chi_{\perp}^{el}}{4\pi}$ et $S_2(0) = \frac{ik_1^3 V_p \chi_{//}^{el}}{4\pi}$. Si toutes les particules ont leurs axes rapides alignés, alors :

$$\tilde{n}_{//} - \tilde{n}_{\perp} = \frac{n_1}{2} \phi_v \Delta \chi^{el} \quad (\text{B.13})$$

où $\phi_v = \rho V_p$ et $\Delta \chi^{el} = \chi_{//}^{el} - \chi_{\perp}^{el}$.

Cas des grains de ferrofluide sous champ

L'approximation de Rayleigh est valide dans le cas des grains de ferrofluide. Cependant, les grains sont soumis à l'agitation thermique et ne sont pas parfaitement alignés. Il faut réaliser les moyennes de $S_1(0)$ et $S_2(0)$ sur l'ensemble de la distribution d'orientation.

Pour faire ce calcul on définit le tenseur polarisabilité, qui vaut dans le référentiel de la particule :

$$\bar{\alpha} = V_p \begin{pmatrix} \chi_{\perp}^{el} & 0 & 0 \\ 0 & \chi_{\perp}^{el} & 0 \\ 0 & 0 & \chi_{//}^{el} \end{pmatrix}_{x'y'z'} \quad (\text{B.14})$$

où z' est l'axe d'anisotropie de la particule, x' et y' sont deux directions perpendiculaires à cet axe.

Après changement de base, on obtient dans le référentiel fixe :

$$\begin{aligned} S_1(0) &= \frac{ik_1^3 V_p}{4\pi} (\chi_{\perp}^{el} + \Delta \chi^{el} \sin^2 \zeta \sin^2 \psi) \\ S_2(0) &= \frac{ik_1^3 V_p}{4\pi} (\chi_{\perp}^{el} + \Delta \chi^{el} \sin^2 \zeta \cos^2 \psi) \end{aligned} \quad (\text{B.15})$$

où ζ et ψ définissent l'orientation de z' par rapport à z . L'expression de l'anisotropie optique devient alors :

$$\tilde{n}_{//} - \tilde{n}_{\perp} = \frac{n_1}{2} \phi_v \Delta \chi^{el} \langle \sin^2 \zeta \cos^2 \psi - \sin^2 \zeta \sin^2 \psi \rangle \quad (\text{B.16})$$

L'expression (1.4) de l'énergie U_{grain} permet de définir la distribution d'orientation des grains :

$$\langle \sin^2 \zeta \cos^2 \psi - \sin^2 \zeta \sin^2 \psi \rangle = \frac{1}{Z} \int_0^{2\pi} d\psi \int_0^{\pi} d\zeta \sin \zeta (\sin^2 \zeta \cos^2 \psi - \sin^2 \zeta \sin^2 \psi) \exp\left(-\frac{U_{\text{grain}}}{k_B T}\right) \quad (\text{B.17})$$

où $Z = \frac{1}{Z} \int_0^{2\pi} d\psi \int_0^\pi d\zeta \sin\zeta \exp(-\frac{U_{\text{grain}}}{k_B T})$ et $\phi_v = \rho V_p$ est la fraction volumique.

Après intégration, on retrouve l'expression (1.12) de l'anisotropie optique :

$$\tilde{n}_{\parallel} - \tilde{n}_{\perp} = \frac{n_1}{2} \phi_v \Delta\chi^{el} \mathcal{L}_2(\xi) K(\sigma) \quad (\text{B.18})$$

Bibliographie

- Bacri, J. C., Perzynski, R., Salin, D., Cabuil, V., and Massart, R. (1986). Magnetic colloidal properties of ionic ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 62(1) :36–46.
- Berne, B. and Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering, with applications to chemistry, biology and physics*. Dover Publications, New York.
- Bibette, J. (1991). Depletion interactions and fractionated crystallization for polydisperse emulsion purification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 147(2) :474–478.
- Bibette, J. (1993). Monodisperse ferrofluid emulsions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 122(1-3) :37–41.
- Birks, J. B. (1950). The properties of ferromagnetic compounds at centimetre wavelengths. *Proceedings of the Physical Society of London Section B*, 63(362) :65–74.
- Bohren, C. F. and Huffman, D. R. (1983). *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Butler, R. F. and Banerjee, S. K. (1975). Theoretical single-domain grain-size range in magnetite and titanomagnetite. *Journal of Geophysical Research*, 80(29) :4049–4058.
- Carrasco, B. and de la Torre, J. G. (1999). Hydrodynamic properties of rigid particles : Comparison of different modeling and computational procedures. *Biophysical Journal*, 76(6) :3044–3057.
- Chaput, F., Boilot, J. P., Canva, M., Brun, A., Perzynski, R., and Zins, D. (1993). Permanent birefringence of ferrofluid particles trapped in a silica matrix. *Journal of Non-crystalline Solids*, 160(1-2) :177–179.

BIBLIOGRAPHIE

- Dormann, J. L., D’Orazio, F., Lucari, F., Tronc, E., Prene, P., Jolivet, J. P., Fiorani, D., Cherkaoui, R., and Nogues, M. (1996). Thermal variation of the relaxation time of the magnetic moment of $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles with interparticle interactions of various strengths. *Physical Review B*, 53(21) :14291.
- Dreyfus, R., Baudry, J., Roper, M. L., Fermigier, M., Stone, H. A., and Bibette, J. (2005). Microscopic artificial swimmers. *Nature*, 437(7060) :862–865.
- Dreyfus, R., Lacoste, D., Bibette, J., and Baudry, J. (2009). Measuring colloidal forces with the magnetic chaining technique. *European Physical Journal E*, 28(2) :113–123.
- Dubois, E. (1997). PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie.
- Feynman, R., Leighton, R., and Sands, M. (1964). *Le cours de physique de Feynman : Electromagnétisme* 2. Addison-Wesley.
- Gazeau, F., Bacri, J. C., Gendron, F., Perzynski, R., Raikher, Y. L., Stepanov, V. I., and Dubois, E. (1998). Magnetic resonance of ferrite nanoparticles : evidence of surface effects. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 186(1-2) :175–187.
- Gosse, C. and Croquette, V. (2002). Magnetic tweezers : Micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical Journal*, 82(6) :3314–3329.
- Hasmonay, E., Dubois, E., Bacri, J. C., Perzynski, R., Raikher, Y. L., and Stepanov, V. I. (1998). Static magneto-optical birefringence of size-sorted $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles. *European Physical Journal B*, 5(4) :859–867.
- Hasmonay, E., Dubois, E., Neveu, S., Bacri, J. C., and Perzynski, R. (2001). Alternating magneto-birefringence of ionic ferrofluids in crossed fields. *European Physical Journal B*, 21(1) :19–29.
- Hu, S. H., Eberhard, L., Chen, J. X., Love, J. C., Butler, J. P., Fredberg, J. J., Whitesides, G. M., and Wang, N. (2004). Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *American Journal of Physiology-cell Physiology*, 287(5) :C1184–C1191.
- Jamon, D., Donatini, F., Siblini, A., Royer, F., Perzynski, R., Cabuil, V., and Neveu, S. (2009). Experimental investigation on the magneto-optic effects of ferrofluids via dynamic measurements. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(9) :1148–1154.
- Janssen, X. J. A., Schellekens, A. J., van Ommering, K., van Ijzendoorn, L. J., and Prins, M. W. J. (2009). Controlled torque on superparamagnetic beads for functional biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(7) :1937–1941.

- Janssen, X. J. A., van Noorloos, J. M., Jacob, A., van Ijzendoorn, L. J., de Jong, A. M., and Prins, M. W. J. (2011). Torsion stiffness of a protein pair determined by magnetic particles. *Biophysical Journal*, 100(9) :2262–2267.
- Koenderink, G. H. (2003). *Rotational and translational diffusion in colloidal mixtures*. PhD thesis, Universiteit Utrecht, Faculteit Scheikunde.
- Landau, L. D. and Lifshitz, E. M. (1960). *Electrodynamics of continuous media*. Pergamon Press, Oxford.
- Liabakk, N. B., Nustad, K., and Espevik, T. (1990). A rapid and sensitive immunoassay for tumor-necrosis-factor using magnetic monodisperse polymer particles. *Journal of Immunological Methods*, 134(2) :253–259.
- Mason, T. G. and Bibette, J. (1996). Emulsification in viscoelastic media. *Physical Review Letters*, 77(16) :3481–3484.
- Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions On Magnetics*, 17(2) :1247–1248.
- Montagne, F., Braconnot, S., Mondain-Monval, O., Pichot, C., and Elaïssari, A. (2003). Colloidal and physicochemical characterization of highly magnetic o/w magnetic emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 24(6) :821–832.
- Montagne, F., Mondain-Monval, O., Pichot, C., Mozzanega, H., and Elaïssari, A. E. (2002). Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 250 :302 – 312.
- Moskowitz, B. M. (1991). Hitchhiker's guide to magnetism, www.irm.umn.edu/hg2m/hg2m_index.html.
- Néel, L. (1949). Influence des fluctuations thermiques sur l'aimantation de grains ferromagnétiques très fins. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De L'Académie Des Sciences*, 228(8) :664–666.
- Néel, L. (1954). Anisotropie magnétique superficielle et surstructures d'orientation. *Journal De Physique Et Le Radium*, 15(4) :225–239.
- Perrin, F. (1934). Mouvement brownien d'un ellipsoïde - i. dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. *Journal de Physique et le Radium*, 5 :497–511.
- Promislow, J. H. E., Gast, A. P., and Fermigier, M. (1995). Aggregation kinetics of paramagnetic colloidal particles. *Journal of Chemical Physics*, 102(13) :5492–5498.

BIBLIOGRAPHIE

- Raikher, Y. L., Stepanov, V. I., Bacri, J. C., and Perzynski, R. (2002). Orientational dynamics of ferrofluids with finite magnetic anisotropy of the particles : Relaxation of magneto-birefringence in crossed fields. *Physical Review E*, 66(2) :021203.
- Ranzoni, A., Janssen, X. J. A., Ovsyanko, M., van IJzendoorn, L. J., and Prins, M. W. J. (2010). Magnetically controlled rotation and torque of uniaxial microactuators for lab-on-a-chip applications. *Lab On A Chip*, 10(2) :179–188.
- Scholten, P. C. (1980). Origin of magnetic birefringence and dichroism in magnetic fluids. *IEEE Transactions On Magnetism*, 16(2) :221–225.
- Shevkoplyas, S. S., Siegel, A. C., Westervelt, R. M., Prentiss, M. G., and Whitesides, G. M. (2007). The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field. *Lab On A Chip*, 7(10) :1294–1302.
- Strick, T. R., Allemand, J. F., Bensimon, D., Bensimon, A., and Croquette, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, 271(5257) :1835–1837.
- Ugelstad, J., Stenstad, P., Kilaas, L., Prestvik, W. S., Herje, R., Berge, A., and Hornes, E. (1993). Mono-disperse magnetic polymer particles - new biochemical and biomedical applications. *Blood Purification*, 11(6) :349–369.
- Usov, N. A., Zhukov, A., and Gonzalez, J. (2007). Single-domain particle with random anisotropy. *Journal of Non-crystalline Solids*, 353(8-10) :796–798.
- van de Hulst, H. C. (1957). *Light scattering by small particles*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- van Ommering, K., Nieuwenhuis, J. H., van IJzendoorn, L. J., Koopmans, B., and Prins, M. W. J. (2006). Confined brownian motion of individual magnetic nanoparticles on a chip : Characterization of magnetic susceptibility. *Applied Physics Letters*, 89(14) :142511.
- Wandersman, E., Dupuis, V., Dubois, E., and Perzynski, R. (2009). Rotational dynamics and aging in a magnetic colloidal glass. *Physical Review E*, 80(4) :041504.
- Zahn, K., Lenke, R., and Maret, G. (1999). Two-stage melting of paramagnetic colloidal crystals in two dimensions. *Physical Review Letters*, 82(13) :2721–2724.

Deuxième partie

Pression de croissance de filaments d'actine

Introduction

Le cytosquelette d'une cellule est un ensemble de filaments protéiques qui se réarrange sans cesse. La dynamique de cette structure est régie uniquement par l'autoorganisation, et pourtant elle est capable de générer des forces dirigées. Dans cette partie nous nous penchons sur ce phénomène fascinant.

Dans un premier chapitre bibliographique on commencera par décrire la nature du cytosquelette et son rôle dans la cellule en s'intéressant plus particulièrement aux contraintes statiques et aux forces dynamiques qu'il peut générer dans différentes situations. On s'attachera à montrer que dans certains processus impliqués dans la migration cellulaire, les moteurs moléculaires ne jouent aucun rôle et c'est bien la seule polymérisation des filaments d'actine qui génère les forces dirigées observées.

Cette propriété relève d'un paradoxe : comment l'addition aléatoire de monomères dans une structure peut-elle engendrer une force dans une direction précise ? Le mécanisme physique qui confère cette capacité au cytosquelette reste à élucider. Des modèles théoriques ont été élaborés. Les expérimentateurs ont tenté de les vérifier par des mesures de force sur des structures du cytosquelette. Mais jusqu'à présent, la trop grande complexité des structures utilisées empêche de sonder directement le mécanisme de génération de force à l'échelle microscopique.

Le deuxième chapitre sera consacré à la présentation du dispositif expérimental que nous avons élaboré pour réaliser des mesures de forces sur des filaments d'actine. Dans ce dispositif, la géométrie et l'organisation des filaments polymérisant contre une charge qu'ils repoussent sont complètement maîtrisées. On justifiera cette affirmation en détaillant les techniques de mesures élaborées pour caractériser la population de filaments d'actine sur lesquelles les mesures sont effectuées. Ce dispositif permet de sonder uniquement la zone d'interaction entre les filaments et la charge, là où a vraiment lieu le mécanisme de génération de force.

Grâce à cet effort de maîtrise de l'organisation, on est capable dans un dernier chapitre de discuter du mécanisme de génération de force observé dans des expériences correspondant à deux situations modèle opposées. Dans l'une, on laisse les filaments libres de s'orienter autour de leur point d'ancrage. Ils restent cependant assez courts pour se comporter comme des bâtonnets et fluctuent donc uniquement de façon rotationnelle. On montrera que ces fluctuations sont à l'origine de la génération d'une force d'origine purement entropique. Dans ce régime une propriété remarquable est observée : la longueur des filaments ne dépend pas de la force qu'on leur applique. Dans l'autre géométrie modèle, les filaments assemblés en faisceaux sont très rigides et poussent directement contre la charge appliquée. Leur longueur dépend maintenant de la force. En s'appuyant sur des simulations numériques, on développera un modèle de génération de force décrivant ce comportement.

Forces générées dans les systèmes biologiques : présentation et
modélisation

3.1 Introduction

La façon dont on appréhende le fonctionnement de la cellule a radicalement changé en quelques décennies. D'abord vue comme une simple poche dans laquelle ont lieu simultanément de multiples réactions chimiques indépendantes et donc étudiables séparément, la cellule est maintenant envisagée comme une entité indivisible, une machinerie organisée dans laquelle les réactions chimiques ont lieu à des endroits bien précis et ont des conséquences sur le comportement de la cellule au sein de son environnement extérieur. Le cytosquelette joue un rôle prépondérant dans ce couplage entre l'activité biochimique de la cellule et son environnement. En effet, les fonctions biologiques principales de ce réseau polymère interconnecté sont les suivantes [Fletcher and Mullins, 2010] :

- (i) Il assure l'organisation spatiale de la cellule, connecte entre elles ses différentes sous-unités (telles que le noyau, les mitochondries ou l'appareil de Golgi) et les maintient dans leur position correcte.
- (ii) Il connecte la cellule avec son environnement, à la fois physiquement (en jouant le rôle de capteur de force) et chimiquement (en assurant l'endocytose et l'exocytose de composés chimiques).
- (iii) Il est capable de produire des forces dirigées pour permettre à la cellule de modifier sa forme et de

se déplacer.

La dénomination "cytosquelette" est donc partiellement trompeuse : même s'il confère aux cellules leurs propriétés mécaniques, celui-ci n'a rien d'un squelette dur de forme figée. Au contraire, c'est un réseau très dynamique dont la structure et la rigidité évoluent continuellement : de nouveaux éléments sont constamment assemblés et désassemblés. Ce remodelage permanent produit des forces à l'origine du mouvement des cellules.

Nous explorons dans ce chapitre les propriétés mécaniques du cytosquelette, que nous mettrons en lien avec les forces qu'il est capable de produire dans des situations très différentes. Cela conduira à examiner comment ces situations ont pu être reproduites expérimentalement pour étudier le mécanisme physique à l'origine de la génération de force. On exposera enfin les modèles théoriques élaborés pour expliquer comment le cytosquelette peut tirer profit des fluctuations thermiques, très importantes à cette échelle, pour produire des forces dirigées.

3.2 Mécanique du cytosquelette

Cette section détaille les principales structures formées par le cytosquelette et s'attache à mettre en évidence la relation entre le rôle, la géométrie et les propriétés mécaniques.

3.2.1 Nature du cytosquelette

Le cytosquelette est un réseau de fibres polymères composées de protéines assemblées entre elles de façon non covalente. Toutes les cellules eukaryotes (*i.e.* possédant un noyau) ainsi que certaines prokaryotes (*i.e.* sans noyau) possèdent un cytosquelette. On distingue trois grandes familles de fibres, qui sont par ordre d'abondance : les microfilaments ou filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces trois réseaux de fibres diffèrent par la nature des protéines qui les composent. Les microfilaments sont composés d'actine, les microtubules de tubuline alors que la classe des filaments intermédiaires regroupe des structures composées de plus de 40 protéines différentes, telles que les lamines ou les kératines (*cf.* paragraphe 3.2.5). Mises bout à bout, les protéines forment d'abord des filaments élémentaires ou protofilaments, qui eux-mêmes assemblés forment les fibres du cytosquelette. La TABLE 3.1 résume les caractéristiques de l'assemblage moléculaire au sein des trois familles de filaments et la FIGURE 3.1 schématise leur structure microscopique.

Les protofilaments de tubuline s'assemblent latéralement, formant une sorte de feuillet qui se roule sur lui-même en un tube creux pour former un microtubule. La plupart des microtubules contiennent 13 protofilaments. Cette structure cylindrique explique la grande rigidité en flexion observée expérimenta-

Type	Masse moléculaire des sous-unités (kDa)	Nombre de protofilaments	Diamètre (nm)
Microtubules	50	13	25
Filaments d'actine	45	2	6
Filaments intermédiaires	40-180	6-10	~10

TABLE 3.1 – Structure des filaments du cytosquelette. *Extrait de [Howard, 2001].*

FIGURE 3.1 – Représentation schématique des filaments du cytosquelette. De gauche à droite : microtubule, filament d'actine, filament intermédiaire.

lement.

Contrairement aux microtubules, les filaments d'actine possèdent dans toutes les cellules la même structure composée de deux protofilaments enroulés en une hélice semblable à un câble.

Les filaments intermédiaires portent cette dénomination car leur diamètre de 10 nm est intermédiaire entre celui des filaments d'actine et celui des microtubules. Alors que l'actine et la tubuline sont des protéines globulaires, les protéines des filaments intermédiaires ont une forme beaucoup plus allongée difficilement discernable au sein des filaments. Ils ressemblent ainsi à des cordes.

3.2.2 Propriétés générales du cytosquelette

Considérées comme des matériaux isotropes, la tubuline, l'actine et la majorité des protéines qui composent les filaments intermédiaires ont un module d'Young semblable, de l'ordre de quelques GPa [Isambert et al., 1995; Gittes et al., 1993; Fraser and Macrae, 1980], ce qui les classe parmi les protéines les plus rigides connues. Cette valeur est comparable au module d'Young de certains plastiques comme le polycarbonate ou le PET. Mais les propriétés mécaniques d'une structure ne dépendent pas que de la rigidité du matériau qui les composent et la géométrie a un rôle primordial : un tube sera par exemple plus résistant qu'une tige pleine. Ainsi, l'assemblage différent des protéines dans les filaments du cytosquelette leur confère des propriétés bien différentes.

A l'échelle des filaments, l'amplitude des fluctuations thermiques est importante et est la conséquence des propriétés mécaniques. Pour décrire la flexibilité d'un filament polymère qui se déforme sous l'effet de l'agitation thermique, on définit la longueur de persistance λ_p comme la longueur de contour au bout de laquelle le filament perd sa directionnalité, c'est à dire la corrélation de sa courbure.

Mathématiquement, on définit la corrélation de la courbure par la moyenne temporelle de $\cos[\theta(s)] -$

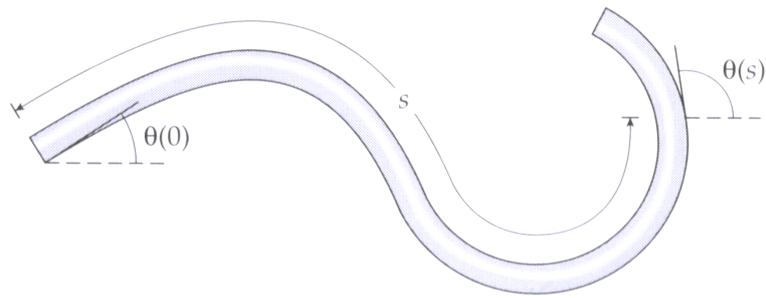


FIGURE 3.2 – Fluctuations thermiques d’un filament polymère. s est l’abscisse curviligne et $\theta(s)$ l’angle que fait la tangente au filament avec l’horizontale. *Extrait de [Howard, 2001].*

$\theta(0)$] (FIGURE 3.2). Cette fonction décroît avec une longueur caractéristique λ_p :

$$\langle \cos[\theta(s) - \theta(0)] \rangle = \exp\left(-\frac{s}{2\lambda_p}\right) \quad (3.1)$$

Notons que l’équation 3.1 est à considérer à deux dimensions.

On peut montrer, en utilisant l’équipartition de l’énergie [Howard, 2001], que

$$\lambda_p = \frac{EI}{k_B T} = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (3.2)$$

où E est le module d’Young, I le moment d’inertie d’une section de filament, k_B la constante de Boltzmann et T la température. Le produit $\kappa = EI$ est le module de courbure. La longueur de persistance traduit donc l’équilibre entre rigidité en flexion du filament et agitation thermique. La TABLE 3.2 donne la valeur de λ_p pour les filaments du cytosquelette ainsi que pour l’ADN.

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

TABLE 3.2 – Longueur de persistance de différents polymères biologiques. *Sources : microtubules, Gittes et al. [1993]; filaments d’actine, Isambert et al. [1995]; filaments intermédiaires, Heins et al. [1993]; Hohenadl et al. [1999]; ADN, Hagerman [1988].*

La comparaison entre la longueur biologique et la longueur de persistance permet de prédire l’as-

pect des structures du cytosquelette observées en microscopie (FIGURE 3.3) : les filaments d'actine apparaissent relativement flexibles, les filaments intermédiaires sont beaucoup plus courbés alors que les microtubules ont la forme de poutres rigides. A titre de comparaison, la très faible λ_p de l'ADN explique qu'il puisse être fortement compacté dans le noyau.

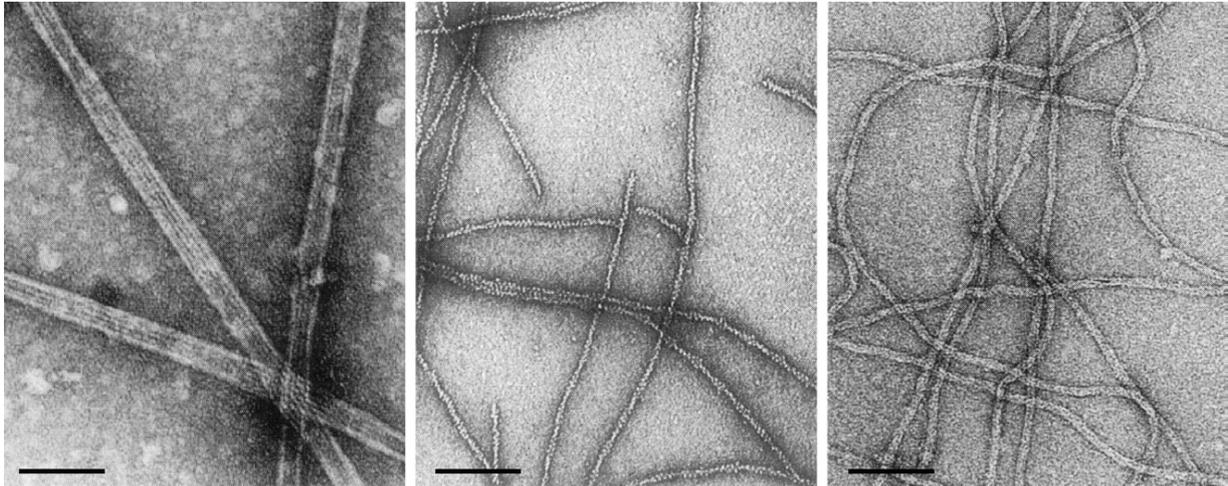


FIGURE 3.3 – Clichés de microscopie électronique à transmission en coloration négative de filaments du cytosquelette. De gauche à droite : microtubules, filaments d'actine, filaments intermédiaires. Barres d'échelle : 100nm. *Adapté de [Howard, 2001].*

On comprend dès lors que les différentes structures du cytosquelette aient des fonctions bien différentes et intimement liées à leurs propriétés mécaniques complémentaires. Ces structures sont détaillées dans les paragraphes qui suivent.

3.2.3 Structures à base de microtubules

Dans la cellule, les microtubules rayonnent vers la membrane depuis un point proche du noyau appelé centrosome. Leur fonction principale est d'organiser le contenu de la cellule. Leur solidité permet de maintenir dans une position et une orientation précises les différents organelles, mais aussi de modifier au besoin leur agencement. C'est le cas lors de la mitose, où le cytosquelette de microtubules réarrange la cellule mère en deux cellules filles. Il crée également une structure spéciale, le faisceau mitotique, qui gère le positionnement des chromosomes pendant les différentes étapes de la division cellulaire.

Les microtubules servent également de support rigide aux vésicules qui sont transportées de et vers l'extérieur de la cellule par des moteurs moléculaires tels que les dynéines ou les kinésines. L'hydrolyse de l'ATP permet à ces protéines de se déplacer par pas le long des filaments du cytosquelette dans une direction donnée.

La rigidité des microtubules est mise à profit dans des types particuliers de cellules. Ce sont eux

qui confèrent la rigidité aux axones des neurones qui peuvent mesurer jusqu'à quelques dizaines de centimètres. Ce sont eux également qui composent les cils que l'on trouve à la surface de certaines cellules, par exemple celles qui tapissent l'intérieur de la trachée. En battant de façon synchronisée, les cils permettent d'expulser le mucus vers l'extérieur des poumons. Enfin, ils composent le flagelle des spermatozoïdes qui leur permet de se déplacer.

3.2.4 Structures à base de filaments d'actine

L'actine est la protéine la plus abondante dans les cellules eukaryotes où elle peut représenter jusqu'à 10% en masse du contenu [Lodish et al., 2003]. Le cytosquelette d'actine est remarquable par la grande diversité de structures qu'il peut adopter. Il doit cette variété à ses propriétés mécaniques intermédiaires mais aussi à la quantité de protéines différentes qui peuvent se lier aux filaments d'actine pour en modifier les propriétés et la géométrie (*cf.* paragraphe 3.6).

Les fibres musculaires sont certainement les structures les plus connues formées par l'actine. Elles sont composées de réseaux de filaments d'actine parallèles de longueur proche de λ_p imbriqués avec des réseaux parallèles de myosine. Cette protéine qui appartient à la famille des moteurs moléculaires permet aux muscles de se contracter en se déplaçant le long des filaments d'actine.

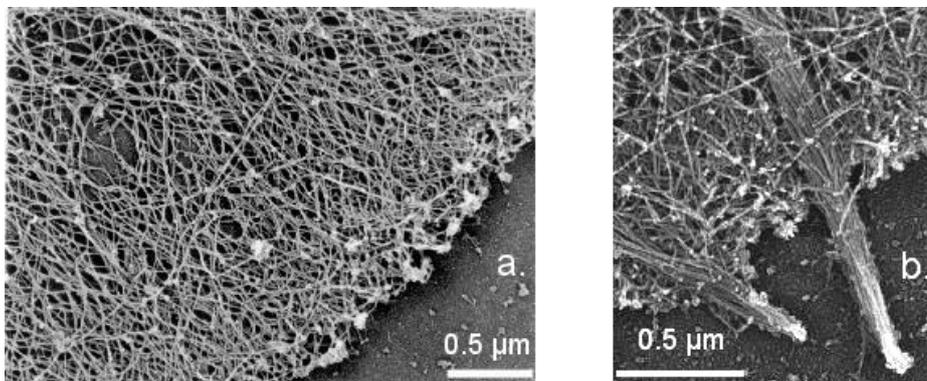


FIGURE 3.4 – Clichés de microscopie électronique en transmission du cytosquelette d'actine de fibroblastes d'embryon de rat présentant (a.) un lamellipode [Svitkina et al., 1995] et (b.) un filopode [Svitkina, 2007].

Mais l'actine forme d'autres structures présentes dans toutes les cellules.

Couplée à la myosine, l'actine forme de longs faisceaux contractiles épais de plusieurs filaments que l'on trouve surtout à la périphérie des cellules, parallèles à la membrane. Certains de ces faisceaux sont terminés par des points d'adhésion à la matrice extracellulaire : ce sont les fibres de stress. Un autre de ces faisceaux se forme de façon transitoire à l'équateur de la cellule en division : l'anneau contractile. En se resserrant, il permet de séparer physiquement les deux cellules-filles.

Grâce à l'effet de certaines protéines dites de branchement, les filaments d'actine peuvent adopter une structure tridimensionnelle isotrope et souple semblable à un gel (FIGURE 3.4a.). Ces structures sous-tendent de larges portions de cellule appelées lamellipodes. D'autres protéines ont la capacité de réticuler un grand nombre de filaments d'actine parallèles pour former un faisceau très résistant à la flexion (FIGURE 3.4b.). On trouve ces faisceaux dans des protrusions de la membrane cellulaire appelées filopodes que la cellule emploie pour sonder son environnement. La structure du cytosquelette d'actine donne leur forme aux cellules, qui peut changer spectaculairement selon les conditions (FIGURE 3.5).

Les images des FIGURES 3.4 et 3.5 mettent en évidence les façons différentes dont lamellipode et filopode soutiennent la tension de la membrane cellulaire. Dans le premier cas une grande densité de filaments de courte taille permet de gonfler le cytoplasme de la cellule sur une grande surface. Dans le second cas, le faisceau de filaments soutient une tension importante et très localisée.

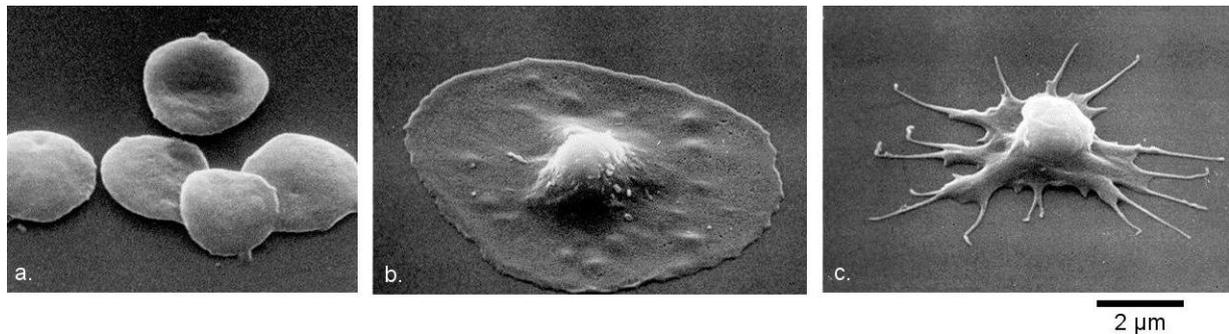


FIGURE 3.5 – Clichés de microscopie électronique à balayage de plaquettes sanguines (a.) au repos ; (b.) étalant un large lamellipode une fois activé par des agents coagulants ; (c.) étendant des filopodes à une étape ultérieure d'activation. *Extrait de [Lodish et al., 2003].*

3.2.5 Structures à base de filaments intermédiaires

Contrairement à leurs deux homologues, les filaments intermédiaires sont beaucoup plus hétérogènes. On peut les ranger en 4 sous-catégories, selon les protéines qui les composent :

- (i) Les lamines, qui forment l'enveloppe du noyau cellulaire.
- (ii) Les kératines, que l'on trouve dans les tissus épithéliaux : la peau, les cheveux, les ongles, mais aussi la laine ou les plumes et les tissus qui recouvrent les cavités du corps.
- (iii) Les filaments intermédiaires dits de type III. On les trouve par exemple dans la glie ou substance blanche, qui entoure et protège les neurones.
- (iv) Les neurofilaments qui assurent le soutien mécanique des axones autour des microtubules.

Il est intéressant de remarquer que malgré un nombre de protofilaments et un module d'Young très similaires aux microtubules (*cf.* paragraphe 3.2.2), les filaments intermédiaires ont une longueur de persistance bien moindre. Contrairement aux faisceaux réticulés de filaments d'actine, il apparaît donc que les protofilaments au sein d'un filament intermédiaire ont très peu de liaisons entre eux et qu'ils peuvent facilement glisser les uns par rapport aux autres. A cet égard, l'analogie entre leur structure et celle d'une corde prend tout son sens : très mous en flexion et en torsion, ils conservent une grande résistance à la traction.

Le rôle *in vivo* des filaments intermédiaires découle naturellement de cette propriété mécanique. Ils sont principalement présents dans les cellules qui requièrent une cohésion multicellulaire importante. Ils forment un réseau de filaments entrecroisés qui traversent la cellule de part en part et s'ancrent dans la membrane, assurant ainsi le maintien du contact avec les cellules voisines et la distribution des forces de traction au sein du tissu.

3.2.6 Conclusion

On a vu dans cette section la grande variété de géométries que peut adopter le cytosquelette et leur intime relation avec les propriétés mécaniques des filaments qui les composent. Ces édifices parfaitement structurés sont d'autant plus remarquable que leur agencement repose uniquement sur l'autoorganisation des sous-unités. La présence de protéines régulatrices variées permet d'obtenir des structures aux propriétés complètement différentes à partir des mêmes sous-unités. Aucun polymère synthétique ne peut encore rivaliser avec ce degré de structuration. Qui plus est, dans de nombreux cas, ces constructions ne sont pas figées mais au contraire hautement dynamiques, alternant dépolymérisation et repolymérisation. C'est ce remodelage permanent qui permet au cytosquelette d'exercer des forces dirigées. On s'intéresse à présent aux différentes façons dont la cellule exploite ces forces dirigées.

3.3 Forces générées par les microtubules

3.3.1 La ségrégation des chromosomes

Lors de la division cellulaire, les chromosomes sont alignés dans le plan équatorial de la cellule-mère puis répartis en deux groupes identiques à ses extrémités qui deviennent les cellules-filles. Le cytosquelette de microtubules joue un rôle primordial dans ce mécanisme.

Au début de la division cellulaire, le centrosome se sépare en deux entités qui migrent à l'opposé l'une de l'autre, formant deux pôles à partir desquels les microtubules rayonnent vers le centre de la cellule. Les microtubules sont capables d'alterner brusquement les phases d'allongement régulier par

polymérisation et de rétrécissement rapide par dépolymérisation. Cette propriété, appelée instabilité dynamique [Mitchison and Kirschner, 1984], leur permet d'explorer l'espace très rapidement à la recherche des chromosomes. Une fois fixés à eux par des moteurs moléculaires, ils les transportent jusqu'au plan équatorial puis les tractent vers les pôles. Ce mouvement ne nécessite ni le déplacement des moteurs moléculaires le long des microtubules, ni l'hydrolyse de l'ATP [Inoue and Salmon, 1995]. L'action unique de la polymérisation et de la dépolymérisation des monomères de tubuline serait donc responsable de la force nécessaire pour respectivement pousser et tirer les chromosomes.

3.3.2 Mesure de force générée par la polymérisation de microtubules

Ces observations *in vivo* ont fait apparaître le besoin de vérifier expérimentalement si la polymérisation de microtubules peut bien produire une force et de mesurer cette force pour la comparer à celle nécessaire au mouvement d'un chromosome.

Une telle expérience a été réalisée par Dogterom and Yurke [1997] sur des microtubules fixés à une de leur extrémité et polymérisant par leur autre extrémité en direction d'un mur rigide. Après avoir atteint le mur, les microtubules continuent à pousser et flambent. L'évolution de la courbure de chaque microtubule est suivie au cours du temps par microscopie optique, ce qui permet de mesurer à la fois la vitesse d'élongation et la force de flambement. Les forces mesurées vont jusqu'à 3 pN par microtubule, pour des vitesses d'environ 5 nm/s. Cette expérience élégante a ouvert la voie vers une meilleure compréhension du mécanisme de génération de force par la polymérisation de filaments du cytosquelette.

La cellule exploite la propriété des microtubules d'alterner très vite les phases de polymérisation et de dépolymérisation lors d'événements transitoires comme la division cellulaire. Les filaments d'actine, dépourvus de cette propriété, sont impliqués dans des processus de génération de force sur des échelles de temps plus longues. Ceci implique des propriétés biochimiques complexes puisqu'une quantité limitée de monomères d'actine doit être constamment assemblée et désassemblée pour produire ces forces. On s'arrête donc longuement dans les sections qui suivent sur ces mécanismes, ce qui permettra d'envisager dans chaque situation la façon dont une force peut être générée.

3.4 La migration cellulaire

3.4.1 Mécanisme

De nombreux processus physiologiques impliquent le déplacement de cellules au sein de leur tissu. On peut citer le développement de l'embryon qui nécessite la réorganisation continue des cellules pour former de nouveaux organes ; les macrophages qui, au cours de la réponse immunitaire, se déplacent dans un tissu infecté pour y détruire les agents pathogènes ; la cicatrisation au cours de laquelle de nombreuses cellules colonisent la plaie pour la réparer ; la production de métastases qui se détachent d'une tumeur cancéreuse et migrent vers un tissu sain pour y établir une nouvelle tumeur.

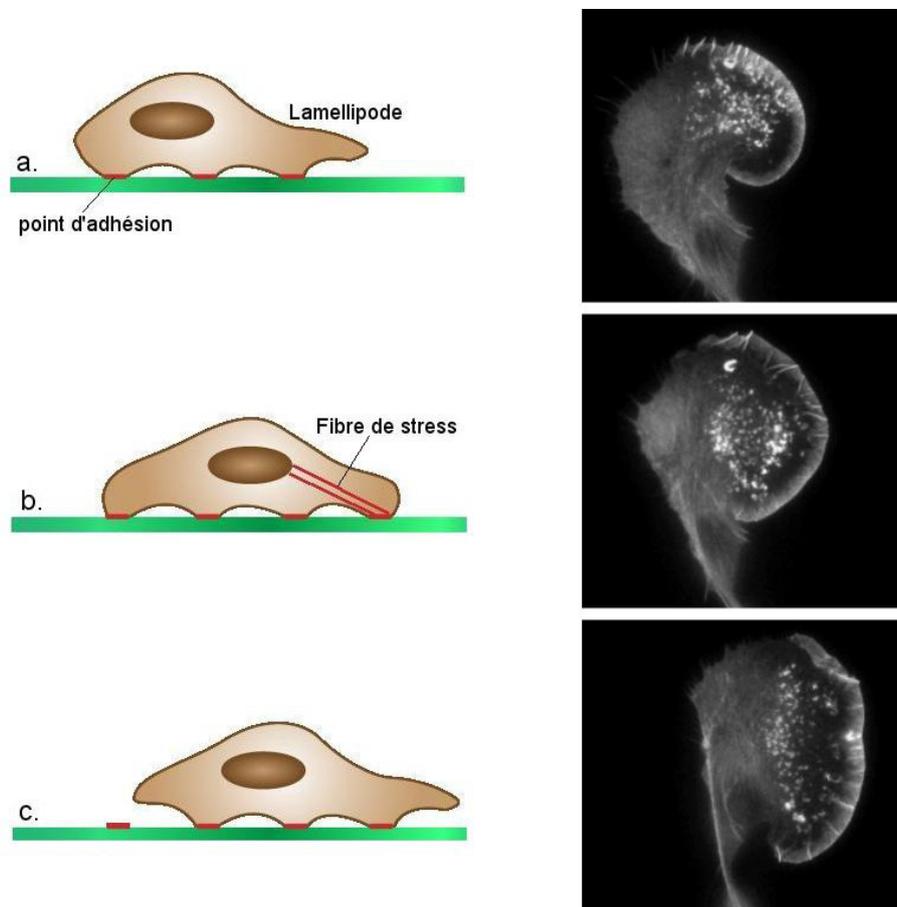


FIGURE 3.6 – *Gauche* : schéma des différentes étapes de la migration cellulaire. *Droite* : motilité d'un mélanome de souris exprimant l'actine couplée à un marqueur fluorescent. *Dessin d'Alexandre Saez et photos extraites de [Small et al., 2002].*

Le processus de migration peut être décomposé en trois étapes (FIGURE 3.6). La dynamique du cytosquelette d'actine joue un rôle primordial dans ce processus pour générer les forces successives de propulsion et de traction.

La première étape correspond à la phase de propulsion. Le front de la cellule se déplace grâce à l'extension du lamellipode (FIGURE 3.6a.). Les filaments d'actine croissant contre la membrane cellulaire repoussent celle-ci vers l'avant, permettant le mouvement d'une large portion de la cellule. Cette étape est celle qui nous intéresse le plus. Il semble que seule la polymérisation d'actine contre la membrane génère la force de propulsion. L'extension du lamellipode peut s'accompagner de projections de filopodes, afin semble-t-il d'assurer une meilleure adhésion au substrat vers l'avant [Lodish et al., 2003]. Sur les photos de la FIGURE 3.6 on voit des faisceaux très fluorescents d'actine qui pourraient donner naissance à des filopodes mais restent à l'état de micropics. La mobilité des cellules résulte de l'équilibre entre propulsion générée par le cytosquelette et friction générée par l'adhésion au substrat.

De nouveaux points d'adhésion au substrat sont ensuite créés (FIGURE 3.6b.), qui serviront de points d'appui au lamellipode pour se propulser vers l'avant. De plus, les fibres de stress auxquels ils sont liés se contractent pour permettre à l'ensemble du corps cellulaire de suivre l'avancée du lamellipode.

Enfin, l'arrière de la cellule se rétracte, grâce au cytosquelette d'actine qui dépolymérise et se détache d'anciens points d'adhésions (FIGURE 3.6c.).

3.4.2 Mesure de force sur cellule entière

Le mécanisme fascinant de migration cellulaire met en lumière la façon dont la biochimie de la cellule et les contraintes mécaniques extérieures sont intimement liées. Une cascade de réactions biochimiques permet à la cellule d'exercer une force sur son milieu extérieur et ainsi de se déplacer. A l'inverse, l'application de contraintes mécaniques modifie le comportement des cellules [Discher et al., 2005]. Il est intéressant de modifier expérimentalement les contraintes mécaniques pour mieux comprendre la biochimie de la cellule et réciproquement de jouer sur les composantes biochimiques pour décrypter les mécanismes de génération de force. C'est tout l'enjeu des expériences de mesures de force qui sont réalisées sur le cytosquelette.

Une donnée macroscopique simple pour rendre compte de l'efficacité des réactions biochimiques impliquées dans la migration cellulaire est la vitesse d'avancée de la cellule en réponse à une force donnée qu'on lui oppose. Cette expérience peut être réalisée en appliquant une barrière de flexibilité connue à des cellules en train de migrer sur un substrat. Cette barrière peut prendre la forme d'une microfibre de verre étiré [Oliver et al., 1995; Heinemann et al., 2011] ou d'une pointe d'AFM [Prass et al., 2006]. Plus la cellule avance, plus la barrière est défléchie et la force appliquée augmente jusqu'à ce que la cellule soit stoppée.

On mesure ainsi un profil vitesse-force qui traduit l'efficacité de la transduction d'énergie biochimique en travail mécanique contre la barrière (FIGURE 3.7). L'augmentation de vitesse à faible force

donc au début de l'expérience est attribuée à l'établissement d'une surface de contact constante entre la cellule et la fibre de verre de forme cylindrique. La géométrie de ce contact est très complexe. D'une part, sa surface est très faible par rapport à celle du lamellipode. D'autre part, la cellule n'est stoppée que momentanément en fin d'expérience. La cellule se réarrange pour passer autour et en-dessous de la pointe fléchie et finit par continuer son chemin.

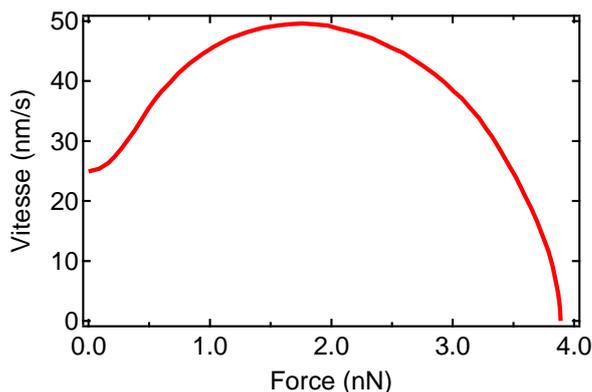


FIGURE 3.7 – Profil vitesse-force d'un lamellipode de kératocyte de poisson. D'après [Heinemann et al., 2011]

Il faut surtout retenir de ces expériences l'ordre de grandeur de la force que peut produire une cellule : de l'ordre du nN.

Sur le plan biochimique, peu de renseignements sont apportés. Quelles sont toutes les protéines impliquées dans le mécanisme de la génération de force ? Quelles sont leurs concentrations ? Il est difficile de répondre à ces questions puisque les conditions biochimiques de l'intérieur de la cellule sont très changeantes et délicates à analyser en temps réel.

3.5 La propulsion intracellulaire de pathogènes

Pour mieux comprendre le phénomène de génération de force par la polymérisation d'actine, on peut se tourner vers des systèmes modèles. La propulsion de certains pathogènes en est un très bon puisque ces organismes reproduisent d'eux-mêmes le phénomène de polymérisation d'actine qui a lieu durant la migration cellulaire.

3.5.1 Description

Certains organismes pathogènes sont capables de détourner les propriétés dynamiques du cytosquelette d'actine à leur propre avantage. Le plus connu est la bactérie *Listeria monocytogenes* responsable

de la listériose. Après avoir infecté une cellule, celle-ci synthétise des protéines promotrices de la nucléation de filaments d'actine, créant ainsi une "comète" de structure semblable à celle du lamellipode qui la propulse à l'intérieur de la cellule à une vitesse pouvant atteindre $1 \mu\text{m/s}$ [Dabiri et al., 1990]. La force de propulsion ainsi créée par la polymérisation de l'actine est assez grande pour permettre à la bactérie de transpercer la membrane cellulaire et d'infecter la cellule voisine, échappant ainsi à la surveillance du système immunitaire (FIGURE 3.8 gauche).

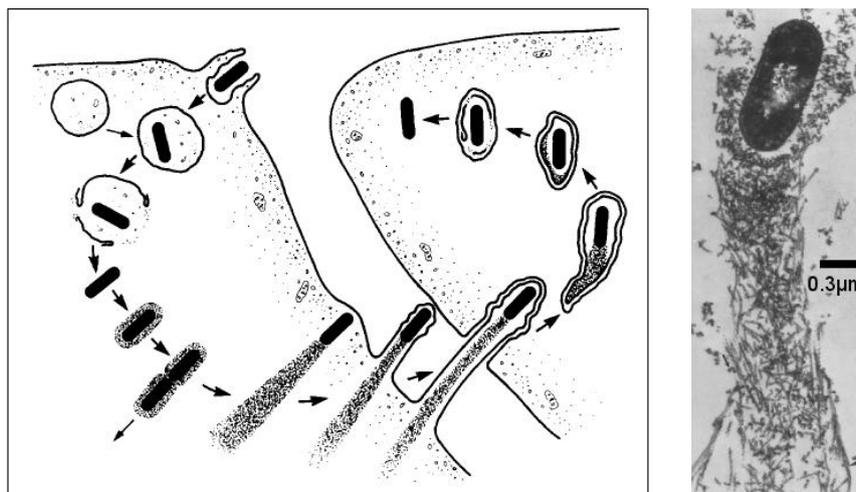


FIGURE 3.8 – Gauche : schéma du cycle d'infection par la bactérie *Listeria* comprenant endocytose, lyse de la membrane, reproduction, détournement du cytosquelette d'actine et propagation dans la cellule voisine. Droite : cliché de microscopie électronique en transmission de la comète d'actine propulsant une bactérie. Extrait de [Tilney and Portnoy, 1989]

La photo de droite de la FIGURE 3.8 illustre le caractère dynamique de la comète : les monomères d'actine sont ajoutés aux filaments en croissance à la surface de la bactérie, formant un réseau dense ; alors que plus loin de la bactérie, les filaments sont déjà en train de dépolymériser.

3.5.2 Mesures de force sur des comètes d'actine

La comète propulsant *Listeria* peut être vue comme une représentation modèle d'un lamellipode constituée uniquement de filaments d'actine polymérisant contre la barrière que représente la bactérie. Depuis les travaux pionniers de Loisel et al. [1999] qui ont reconstitué la motilité de *Listeria* à partir d'un ensemble minimal de protéines purifiées, il est possible de générer *in vitro* des comètes d'actine dans des conditions biochimiques maîtrisées.

Cameron et al. [1999] ont franchi une autre étape dans la simplification du système en propulsant avec des comètes d'actine des billes de polystyrènes décorées de ActA, des protéines nucléatrices des filaments d'actine (*cf.* section 3.6), mais dans des conditions biochimiques non maîtrisées (milieu fabriqué

à partir d'extrait cellulaire). L'intérêt de cette expérience est de pouvoir faire varier la taille des objets propulsés et ainsi la force opposée à la comète. Cependant aucune différence importante de vitesse entre des billes de diamètre allant de 0.2 à 0.9 μm n'est observée. Wiesner et al. [2003] parviennent au même résultat dans un milieu de protéines purifiées.

Pour faire varier la force appliquée à la comète d'actine, une méthode très utilisée consiste à viscosifier le milieu par ajout de méthylcellulose, qui par son poids moléculaire élevé, permet d'altérer uniquement la vitesse de diffusion des gros objets. L'hypothèse faite est donc que la polymérisation des filaments d'actine n'est pas affectée puisque la diffusion à l'échelle des monomères d'actine n'est que peu ralentie. En ce basant sur ce principe, McGrath et al. [2003] ont pu mesurer la vitesse de *Listeria* dans un extrait cellulaire (FIGURE 3.9) en fonction de la force visqueuse exercée sur la bactérie par des concentrations croissantes de méthylcellulose. La force est donc ici calculée et non pas mesurée, comme dans les expériences précédentes sur les cellules entières. Le profil vitesse-force obtenu dans ce cas est totalement différent puisque sa forme est convexe. La vitesse chute fortement aux faibles valeurs de force puis tend de façon asymptotique vers zéro. Les conditions expérimentales ne permettent pas d'atteindre une force suffisante pour stopper complètement la comète. Cependant, on s'aperçoit que les forces sondées sont du même ordre de grandeur qu'avec les cellules entières. Ce résultat rend raisonnable l'hypothèse selon laquelle la seule polymérisation d'actine peut être responsable de la force de propulsion générée pendant la migration cellulaire.

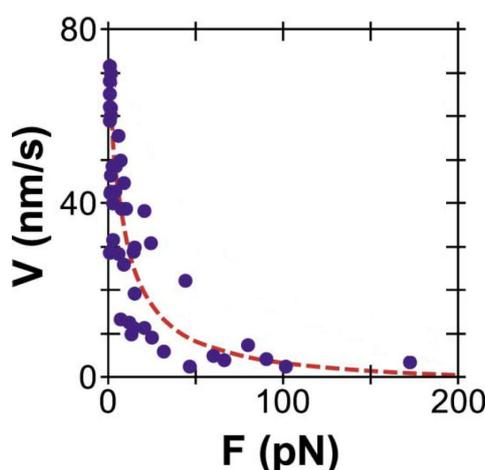


FIGURE 3.9 – Profil vitesse-force de *Listeria*. La courbe pointillée correspond à un fit par un modèle empirique. Extrait de [McGrath et al., 2003]

Là encore, le système est trop complexe pour pouvoir généraliser ce résultat. Ceci est illustré de façon frappante par les travaux de Wiesner et al. [2003] qui, en ajoutant de la méthylcellulose à leurs

billes de polystyrène dans un milieu de protéines purifiées, ne mesurent pas de variation significative de la vitesse jusqu'à une force visqueuse de 50pN. Dans une expérience similaire en extrait cellulaire et avec un dispositif expérimental de géométrie différente, Cameron et al. [2004] semblent, eux, voir un effet d'amortissement dû à la viscosité. Enfin, la densité de protéines nucléatrices à la surface de l'objet propulsé semble aussi jouer un rôle crucial sur le mouvement, qui passe de continu à saltatoire quand celle-ci augmente [Bernheim-Groswasser et al., 2005].

Il faut souligner que la méthylcellulose modifie tout de même la géométrie de la comète puisque les filaments tendent à s'organiser en faisceaux sous son action. Il se peut donc que son ajout dans le milieu ait une action sur la vitesse non reliée à son effet viscosifiant dont Wiesner et al. [2003] tentent de tenir compte en normalisant les vitesses observées par la vitesse mesurée dans un milieu contenant la même concentration d'une forme non viscosifiante de méthylcellulose.

Une autre manière de faire varier la force visqueuse s'exerçant sur une bille de polystyrène est d'utiliser le phénomène de lubrification qui augmente la viscosité apparente près d'une surface [Shaevitz and Fletcher, 2007]. Cet effet est inversement proportionnel au diamètre des objets donc là encore, seul le coefficient de diffusion des billes de polystyrène est modifié, pas celui des protéines. Les expériences de Shaevitz and Fletcher [2007], réalisées dans un extrait cellulaire, montrent une réduction de la vitesse de propulsion des billes avec la viscosité.

Le système des comètes d'actine est une approche intéressante puisqu'il permet de créer des forces dirigées sur des objets dans des conditions biochimiques maîtrisées. Mais les problèmes d'interaction entre l'objet propulsé et la comète d'actine restent complexes et peuvent mener à des résultats expérimentaux différents à partir de systèmes très semblables.

3.5.3 Mesures de force sur gels d'actine

Pour s'affranchir des problèmes d'interaction bille-comète décrits au paragraphe précédent, une approche intéressante inspirée de la technique présentée au paragraphe 3.4.2 consiste à opposer une barrière flexible à la croissance d'un gel d'actine dont la polymérisation est induite sur une surface fixe.

L'expérience conçue par Marcy et al. [2004] est intermédiaire : la polymérisation d'une comète d'actine est induite sur une bille de polystyrène de 2 μm de diamètre maintenue par une tige de flexibilité connue dans un milieu de protéines purifiées. L'arrière de la comète est maintenue par dépression grâce à une pointe de micropipette dont le déplacement permet d'exercer sur le gel des forces de traction ou de compression. Ces forces sont mesurées par la déflexion de la tige (FIGURE 3.10). A force nulle, la vitesse

vaut environ $2 \mu\text{m}/\text{min}$, soit $33 \text{ nm}/\text{s}$, ce qui est du même ordre de grandeur que la vitesse mesurée FIGURE 3.9 pour un objet propulsé de taille similaire.

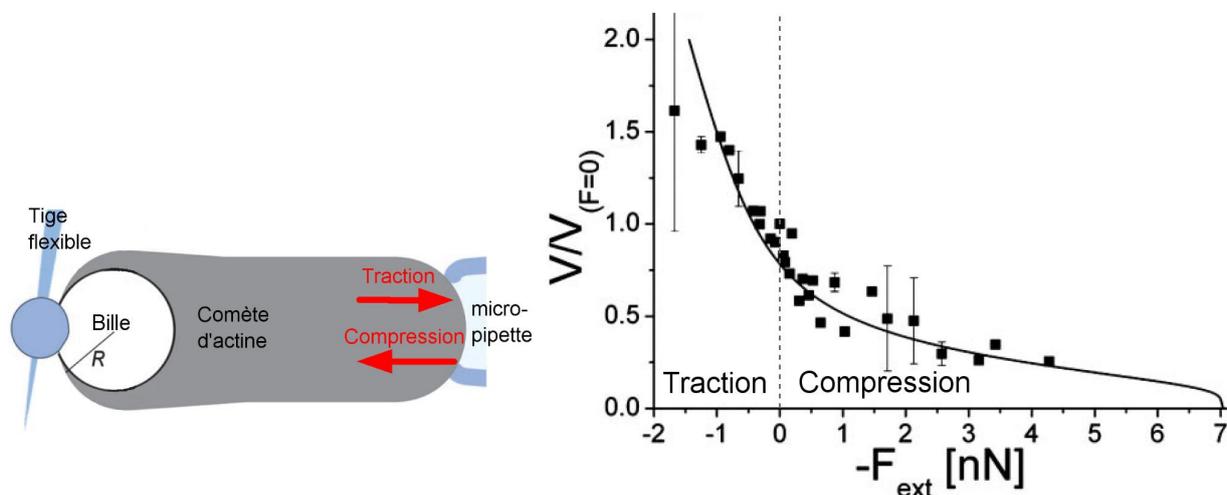


FIGURE 3.10 – Schéma expérimental et profil vitesse-force en traction et compression d'un gel d'actine en croissance. $V_{F=0}$ vaut environ $2 \mu\text{m}/\text{min}$. Extrait de [Marcy et al., 2004]

Les mesures en traction permettent de sonder l'élasticité du gel d'actine et la force du lien avec la bille de polystyrène, validant ainsi le modèle élastique de Gerbal et al. [2000]. En compression, les mesures montrent là encore un profil vitesse-force convexe tendant asymptotiquement vers zéro. Ce dispositif permet d'exercer des forces 10 à 100 fois plus grandes que dans l'expérience de McGrath et al. [2003]. Pourtant là encore, la *stall force* n'a pu être atteinte puisqu'au-delà de 4.3 nN , on observe le flambement de la comète.

Abandonnant la géométrie de la comète et les problèmes de courbure associés, Parekh et al. [2005] font croître un gel d'actine sur la surface plane d'un cantilever d'AFM. Le gel s'allonge librement jusqu'à rencontrer une barrière rigide. La déflexion du cantilever permet alors d'exercer une force sur le gel tout en mesurant sa vitesse d'élongation. La force appliquée augmente avec la déflexion du cantilever donc avec la croissance du gel, jusqu'à stopper l'élongation. Le profil vitesse-force entier peut donc être mesuré sur un même gel (FIGURE 3.11). Trois phases sont systématiquement observées lors de la croissance : (a) une phase transitoire considérée comme non pertinente pendant laquelle la vitesse augmente avec la force ; (b) une phase linéaire où la vitesse est indépendante de la force ; (c) une phase de ralentissement jusqu'à l'arrêt. Les expériences sur différents gels sont difficilement comparables entre elles car la densité de protéines nucléatrices greffées sur le cantilever et la taille du gel ne sont pas maîtrisées. Il est de même difficile de comparer la gamme de force sondées dans ces travaux et ceux de Marcy et al. [2004].

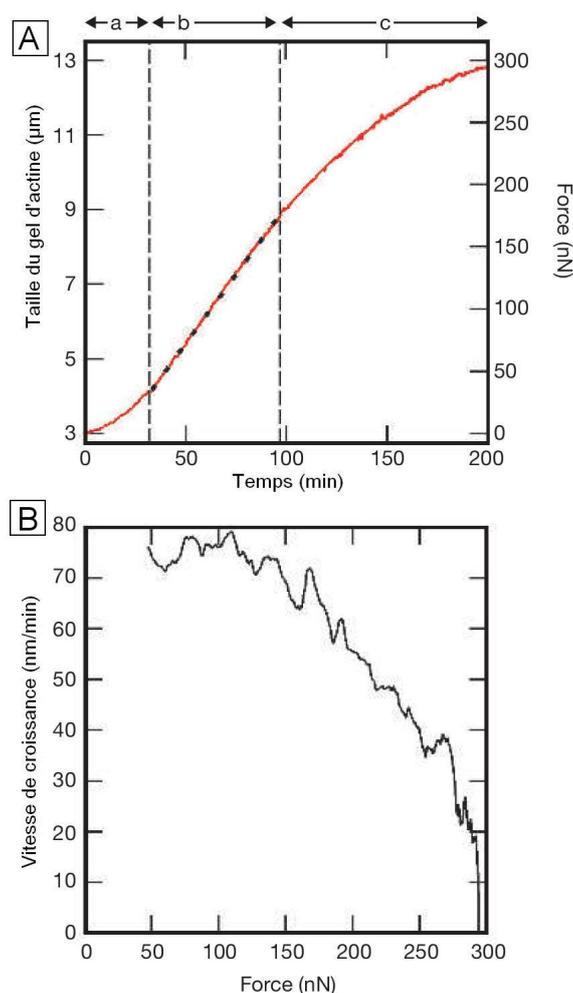


FIGURE 3.11 – Profil vitesse-force réalisé sur un même gel d'actine et présenté de 2 façons différentes. A : évolution temporelle de la longueur et de la force. B : évolution de la vitesse (dérivée de A) en fonction de la force. *Extrait de [Parekh et al., 2005]*

Un résultat important de cette expérience est que la vitesse mesurée dépend de l'histoire du gel. Avec un même gel, deux vitesses différentes peuvent exister pour la même force : si la force est ramenée à une faible valeur après avoir laissé pousser le gel pendant quelques minutes, la vitesse d'élongation est plus rapide qu'avant. L'augmentation de la force exercée induit donc sûrement une réorganisation durable des filaments d'actine au sein du gel. Cette réorganisation a été mise en évidence en réalisant des mesures de module élastique avec le même dispositif expérimental en faisant osciller le cantilever [Chaudhuri et al., 2007]. Ces expériences révèlent un durcissement du gel après l'application d'une forte force.

Cette modification avec la force des propriétés élastiques du gel montre qu'il est difficile d'isoler la contribution à la force mesurée de l'élongation des filaments dans la zone de contact. C'est davantage une propriété macroscopique qui est sondée plutôt que l'interaction entre les filaments en croissance et

la charge.

Les systèmes expérimentaux exposés dans ce paragraphe montrent que la polymérisation d'un gel d'actine peut engendrer une force qu'il est possible de mesurer et qui est du même ordre de grandeur que la force exercée contre une barrière par une cellule en train de migrer. Elles illustrent aussi combien la nature du contact entre l'actine et la charge propulsée est complexe. En fonction de la géométrie et de la biochimie du système, le profil vitesse - force peut avoir une allure complètement différente. Il est donc primordial de bien maîtriser l'organisation des filaments d'actine pour pouvoir interpréter proprement les mesures de force effectuées.

3.5.4 Mesures de force sur filament unique

Afin de sonder véritablement l'interaction entre filaments en croissance et charge, le dispositif expérimental idéal serait un filament unique polymérisant contre une barrière. Cette expérience a été réalisée par Dogterom and Yurke [1997] sur les microtubules (*cf.* paragraphe 3.3.2) mais elle n'est pas directement transposable aux filaments d'actine. D'abord leur petite taille les rend plus difficiles à manipuler individuellement. Mais surtout, du fait de leur λ_p beaucoup plus courte, ils flamberaient à des longueurs trop petites pour être observables à proximité d'une paroi.

Berro et al. [2007], reprenant l'expérience élaborée par Kovar and Pollard [2004], ont contourné ce problème en observant en microscopie de fluorescence à ondes évanescentes (TIRF) le flambement de filaments d'actine immobilisés à leurs extrémités par deux protéines : une myosine inactive et une formine. Cette dernière protéine fixe le filament à son extrémité en croissance tout en favorisant l'addition processive de nouveaux monomères. Après une période de croissance, les filaments ainsi comprimés aux deux extrémités flambent, produisant une force maximale de l'ordre du pN. Malheureusement, il n'est pas possible de mesurer la vitesse correspondante ni d'atteindre la *stall force*. De plus, cette géométrie est assez éloignée de la configuration idéale puisque l'extrémité en croissance n'est pas libre et ne polymérise pas contre une charge.

En conclusion, nous avons mis en évidence dans les sections précédentes le défi expérimental que représente la mesure de force générée par le cytosquelette. Il est nécessaire de bien contrôler tous les paramètres biochimiques du système car la réorganisation du gel d'actine aboutit à une vitesse mesurée complètement différente. Pour mieux comprendre comment ces modifications peuvent avoir lieu, étudions maintenant l'aspect biochimique de la polymérisation de l'actine.

3.6 Biochimie de l'actine

Les mécanismes de génération de force par le cytosquelette sont dépendants de la capacité de celui-ci à polymériser et dépolymériser à façon dans des géométries différentes. Or, un polymère synthétique qu'on laisse évoluer dans des conditions similaires à celles du cytosquelette va tendre vers une situation d'équilibre. Pour le modifier, c'est à dire dépolymériser ou recommencer à polymériser, il est nécessaire de changer les conditions du milieu. L'échelle de temps d'un tel changement est beaucoup trop grande par rapport aux observations *in vivo*. Comment le cytosquelette est-il maintenu hors équilibre et comment peut-il évoluer aussi vite ? On détaille dans cette section les mécanismes biochimiques qui confèrent cette capacité au cytosquelette. On s'intéressera uniquement à la biochimie des filaments d'actine qui de par leur abondance, leur propriétés mécaniques intermédiaires et leur diversité de structures, sont les plus impliqués dans la production de force.

3.6.1 Les filaments d'actine sont polarisés

Les monomères d'actine sont polaires et s'assemblent toujours dans le même sens : on parle de bout barbé et de bout pointu des sous-unités. L'origine de cette dénomination provient des observations de filaments d'actine isolés de fibres musculaires mais encore complexés par des têtes de myosine qui s'orientent dans un sens précis sur le filament, le faisant ressembler à un empilement de pointes de flèches (FIGURE 3.12). Les constantes cinétiques d'association et de dissociation d'un monomère sont plus grandes au bout barbé qu'au bout pointu. En conséquence, les deux extrémités d'un filament d'actine ont des propriétés cinétiques et thermodynamiques différentes.

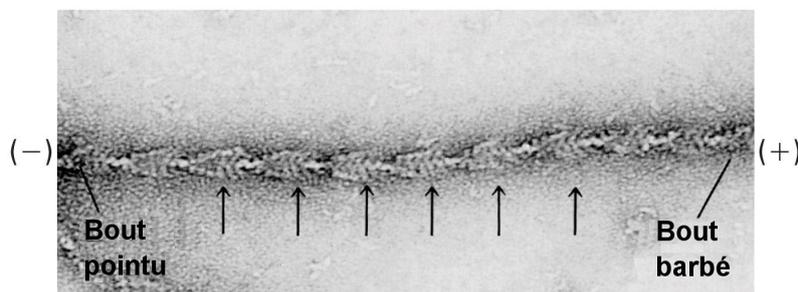


FIGURE 3.12 – Filament d'actine décoré de têtes de myosine, sur lequel on a repéré les structures en forme de pointe de flèche. *Extrait de [Lodish et al., 2003].*

Chaque monomère fixe une molécule d'ATP qui s'hydrolyse en ADP quelques temps après son incorporation dans un filament. Cette hydrolyse n'entraîne aucun changement de conformation majeur comme ceux qui permettent aux moteurs moléculaires de produire un travail, mais modifie les propriétés

thermodynamiques du monomère. Ainsi, la dépolymérisation est plus favorisée pour un monomère ADP que pour un monomère ATP. L'hydrolyse de l'ATP introduit une différence supplémentaire entre les extrémités barbées du filament qui a plus de chance d'être ATP et l'extrémité pointue qui a plus de chance d'être ADP. La façon dont l'ATP est hydrolysé dans le filament peut modifier la façon dont le filament s'allonge [Ranjith et al., 2010].

Wegner [1976] a montré que dans une certaine gamme de concentration en actine monomérique, les filaments peuvent polymériser par leur extrémité barbée en même temps qu'ils dépolymérisent par leur extrémité pointue. Ce phénomène a été baptisé *treadmilling* ou tapis roulant, car les monomères d'actine qui dépolymérisent à l'extrémité pointue deviennent à nouveau disponibles pour polymériser à l'autre extrémité. Ainsi, dans le lamellipode, l'extrémité barbée par laquelle les filaments s'allongent est dirigée contre la membrane alors que l'extrémité pointue par laquelle ils dépolymérisent est située plus à l'intérieur de la cellule.

Cette capacité de l'actine à dépolymériser spontanément après un certain temps permet à la cellule de conserver une concentration élevée de monomères en solution, contribuant ainsi à maintenir le système loin de l'équilibre. Cependant, le *treadmilling* seul ne suffit pas à expliquer les vitesses de polymérisation élevées de l'actine observées *in vivo* [Pantaloni et al., 2001]. L'action des protéines régulatrices est primordiale pour atteindre ces vitesses.

3.6.2 Les protéines régulatrices

Les nombreuses protéines qui peuvent se lier au cytosquelette d'actine lui confèrent sa grande plasticité structurelle mais lui permettent aussi de se maintenir hors équilibre. La fonction des principales protéines régulatrices que l'on trouve dans les lamellipodes et les filopodes des vertébrés est schématisée

FIGURE 3.13 :

(a) Pour exercer une force vers l'avant, il est nécessaire dans ces deux structures qu'un grand nombre de filaments en croissance soient localisés près de la membrane cellulaire qui doit se déplacer. Des protéines de couplage telles que N-WASP ou VASP maintiennent les filaments près de la membrane.

(1b) et (2b) Le complexe Arp2/3, activé par les protéines membranaires de la famille WASP ou par ActA, est capable de nucléer de nouveaux filaments par branchement de filaments préexistants. Dans le lamellipode, ces étapes de nucléation-croissance se succèdent un grand nombre de fois pour créer un réseau arborescent qualifié de "dendritique". Dans le filopode ces étapes n'ont lieu qu'une seule fois.

(1c) et (2c) La génération de force par la polymérisation de filaments d'actine nécessite un point d'ancrage dans le réseau qui les supporte, sinon ils reculeraient. Dans le lamellipode, les branchements par Arp2/3 pourraient jouer ce rôle alors que dans le filopode la fascine, une protéine réticulant les filaments parallèlement entre eux, maintient une forte cohésion du faisceau d'actine. Ces deux protéines ont un rôle déterminant sur les propriétés mécaniques des filaments d'actine.

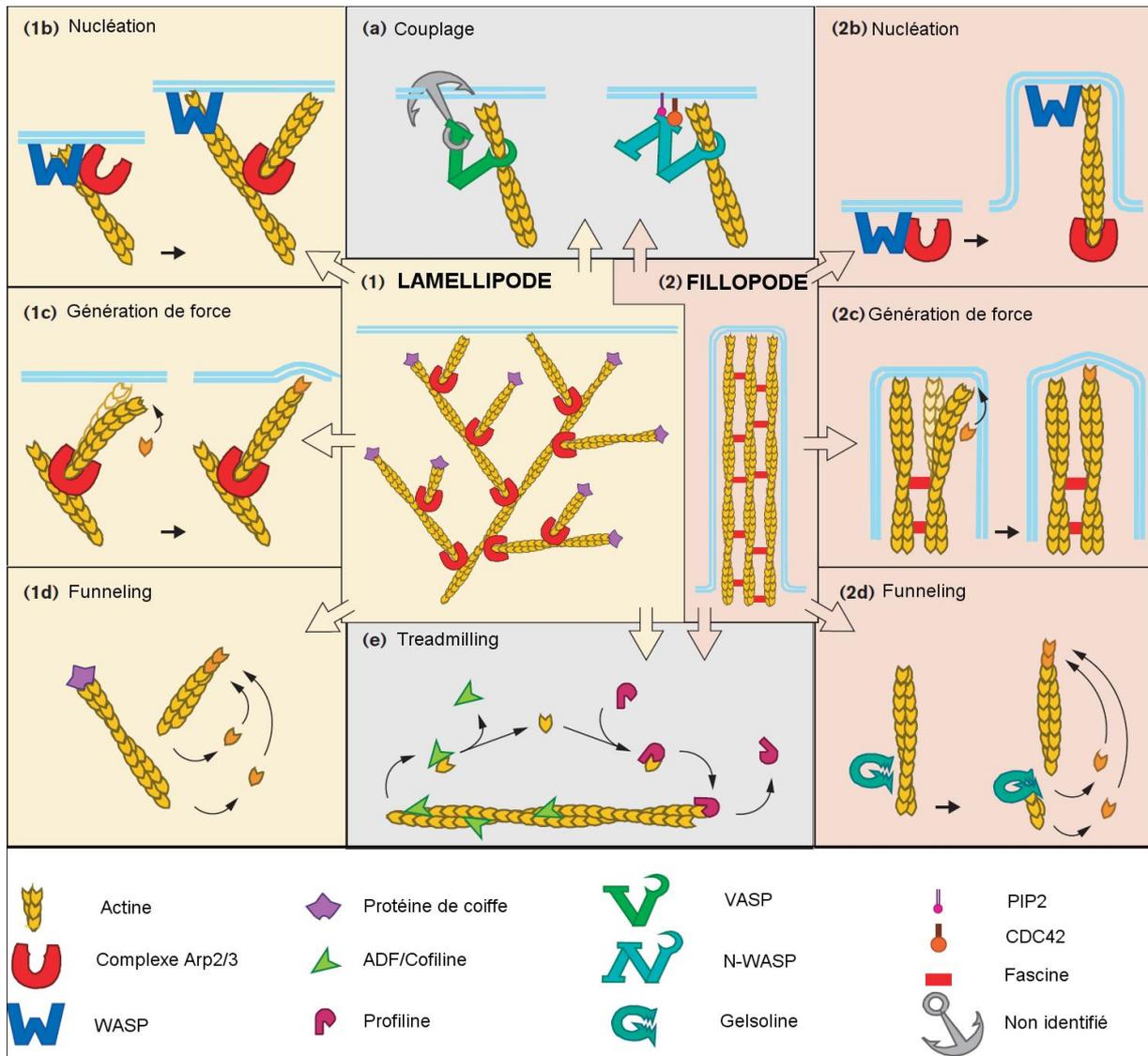


FIGURE 3.13 – Les principales protéines régulatrices du cytosquelette d'actine et leur fonction dans (1) le lamellipode et (2) le filopode. *Extrait de [Borisy and Svitkina, 2000].*

(1d) et (2d) Les protéines de cappe couvrent l'extrémité barbée des filaments devenus inutiles à la génération de force pour les empêcher de polymériser. La gelsoline possède la capacité de couper un filament en deux fragments et de capper la nouvelle extrémité barbée ainsi créée. L'action de ces deux types de protéines multiplie le nombre d'extrémités pointues libres, ce qui d'une

part accélère la dépolymérisation et d'autre part concentre les monomères libres sur un faible nombre de filaments en croissance dont la vitesse d'allongement se trouve augmentée [Carlier and Pantaloni, 1997]. Ce mécanisme a été appelé *funneling*.

(e) La propriété intrinsèque de *treadmilling* est accélérée par l'action de plusieurs protéines. La profiline, activée par WASP, VASP ou la formine, augmente la vitesse de polymérisation au bout barbé alors que l'ADF/cofiline augmente la vitesse de dépolymérisation au bout pointu. Cependant, la profiline seule a des propriétés de séquestration : elle se lie aux monomères d'actine et les empêche de s'ajouter à une extrémité en croissance, ce qui a pour effet de maintenir une grande concentration de monomères disponibles pour un éventuel futur événement de génération de force.

La description précédente est forcément simplifiée puisque plus de 40 protéines ont été identifiées comme ayant un rôle régulateur des propriétés du cytosquelette d'actine. En outre, il est souvent réducteur d'associer une fonction précise à une protéine, qui a souvent un rôle physiologique complexe pouvant évoluer selon son couplage avec d'autres protéines.

Les propriétés biochimiques de l'actine permettent de comprendre comment, selon la disponibilité des protéines régulatrices, un processus basé sur l'autoorganisation peut d'une part générer des structures différentes à partir du même ensemble de monomères de départ et d'autre part rester loin de l'équilibre. On a mis en lumière les deux rôles principaux des protéines régulatrices dans la dynamique du cytosquelette : (i) accélérer la cinétique de polymérisation et dépolymérisation pour générer des forces plus rapidement ; (ii) rigidifier la structure pour exercer des forces plus grandes. En revanche, la biochimie ne permet pas d'expliquer l'origine physique de la génération de force.

3.7 Comment la polymérisation génère-t-elle une force ?

3.7.1 Bilan thermodynamique hors équilibre

Une grande partie de l'énergie chimique dont les cellules ont besoin pour leur métabolisme est stockée sous la forme de nucléotides triphosphates tels que l'ATP. De nombreuses protéines ont la faculté d'hydrolyser ces nucléotides en leur forme diphosphate pour restituer cette énergie et l'utiliser. La myosine fait partie de ces protéines : l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP lui permet de se déplacer le long des filaments d'actine. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de la force de traction générée dans les muscles. Par analogie, il semblerait raisonnable de penser qu'un moteur moléculaire semblable à la myosine est responsable de la force exercée contre la membrane par le cytosquelette d'actine dans les

3.7. Comment la polymérisation génère-t-elle une force ?

lamellipodes et les filopodes. Pourtant Loisel et al. [1999] ont montré que la présence de moteur moléculaire n'était pas nécessaire pour générer des forces. La seule polymérisation de l'actine en présence de trois protéines régulatrices (Arp2/3, ADF/cofiline et protéine de cappe) permet à des *Listeria* de se propulser *in vitro* en reconstituant une comète.

La seule polymérisation de l'actine peut donc libérer assez d'énergie pour générer une force. De simples arguments thermodynamiques permettent de comprendre comment un système maintenu hors équilibre comme le cytosquelette d'actine peut fournir constamment de l'énergie utilisable pour générer une force contre une charge [Hill and Kirschner, 1982]. Considérons la réaction d'addition d'un monomère d'actine M au polymère en croissance P qui passe alors de n à $n+1$ sous-unités :



Le potentiel chimique d'un monomère en solution est :

$$\mu_S = \mu_0 + k_B T \ln C \quad (3.4)$$

Le potentiel chimique d'un monomère au sein du polymère μ_P est constant si l'on considère celui-ci comme un solide incompressible. Avec cette hypothèse, la constante de dissociation K_d est égale à la concentration de monomères en solution à l'équilibre. Il est donc d'usage de parler de concentration critique C_C plutôt que de K_d . A l'équilibre, on écrit donc :

$$\mu_P = \mu_S = \mu_0 + k_B T \ln C_C \quad (3.5)$$

La comparaison des valeurs de C et C_C permet de prédire l'évolution du système (FIGURE 3.14) :

Cas 1 : $C > C_C$. La différence d'énergie libre ΔG pour le réaction de passage d'un monomère de la solution au polymère est :

$$\Delta G = -\mu_S + \mu_P = -k_B T \ln \left(\frac{C}{C_C} \right) < 0 \quad (3.6)$$

Cela se traduit par l'élongation spontanée du filament et la libération d'énergie par le système.

Cas 2 : $C = C_C$. $\Delta G = 0$ et la longueur moyenne du filament reste constante.

Cas 3 : $C < C_C$. $\Delta G > 0$ et le filament raccourcit spontanément, stockant ainsi de l'énergie.

L'énergie libre libérée par la polymérisation de l'actine peut donc en théorie être réutilisée par le système, en particulier sous forme de travail. Considérons le cas idéalisé d'un filament rigide ancré fixement à une extrémité et polymérisant contre une charge mobile exerçant sur lui une force F prise

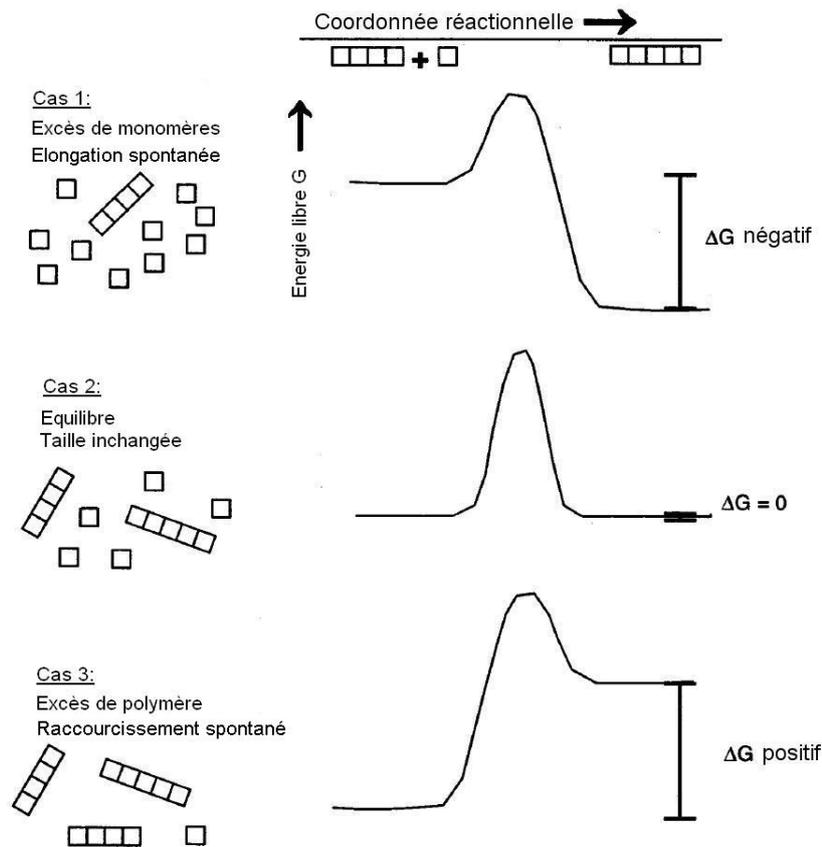


FIGURE 3.14 – Trois situations possibles pour la polymérisation de filaments d’actine en solution, illustrant comment la polymérisation peut libérer ou stocker de l’énergie. *Extrait de [Theriot, 2000].*

de signe positif (FIGURE 3.15). Cette charge serait la membrane cellulaire dans une situation réelle. L’insertion d’un monomère de taille δ doit déplacer la charge d’une longueur δ et donc produire un travail $W = -F\delta$ fourni par l’énergie libre libérée par la polymérisation. L’énergie libérée par la réaction en présence d’une force devient donc :

$$\Delta G_F = \Delta G + F\delta \quad (3.7)$$

On conçoit intuitivement que l’application d’une force à un filament en croissance va modifier l’équilibre thermodynamique de la réaction donc la concentration critique qui devient C_C^F . La relation (3.7) permet de prédire cet effet en écrivant que $\Delta G_F = -k_B T \ln\left(\frac{C}{C_C^F}\right)$. On a alors :

$$C_C^F = C_C \exp\left(\frac{F\delta}{k_B T}\right) \quad (3.8)$$

L’application d’une force de compression sur le filament augmente la concentration critique, et la réaction dans le sens de la polymérisation devient moins favorisée. Si l’on augmente F , on atteint la

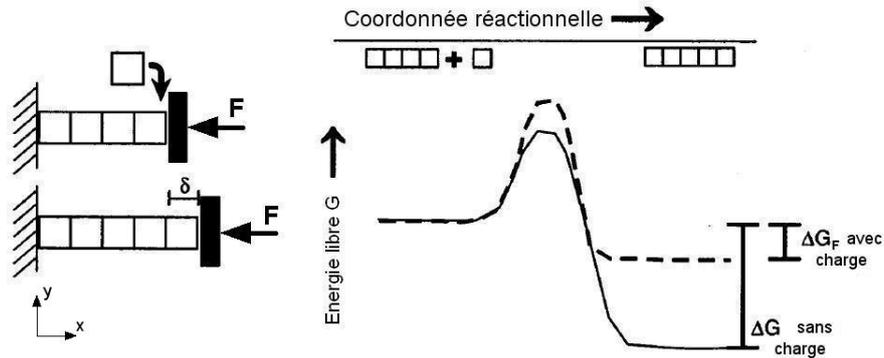


FIGURE 3.15 – Polymérisation d'un filament sous charge et production de travail. *Extrait de [Theriot, 2000].*

force maximale qu'un filament peut supporter sans dépolymériser : la force d'arrêt ou *stall force* F_{stall} . A cette valeur, la longueur moyenne du filament est constante car toute l'énergie libérée est transformée en travail donc $\Delta G_F = 0$. D'après la relation (3.7) on a :

$$F_{\text{stall}} = \frac{k_B T}{\delta} \ln \left(\frac{C}{C_C} \right) \quad (3.9)$$

Si F augmente au-delà de cette valeur, ΔG_F devient positif : l'application de la charge provoque alors la dépolymérisation du filament [Hill, 1981].

On peut aussi envisager de se placer dans des conditions telles que le filament dépolymérise ($\Delta G > 0$) et peut alors fournir un travail positif sur la paroi, c'est à dire tirer la charge vers la gauche (FIGURE 3.15). C'est vraisemblablement ce qui se passe lorsque les microtubules tirent les chromosomes du plan équatorial de la cellule vers les pôles lors de la division cellulaire (*cf.* paragraphe 3.3.1).

La thermodynamique permet de donner le rendement maximal qui peut être tiré de la conversion d'énergie libre de polymérisation en travail mécanique : $F\delta/\Delta G$. Mais elle ne renseigne pas sur le mécanisme qui produit cette conversion et ne donne donc aucune indication sur la vitesse de transduction réelle d'énergie chimique en énergie mécanique.

3.7.2 Aspects cinétiques

Si l'on considère la réaction (3.3) d'un point de vue cinétique, avec une constante cinétique d'addition de monomères k_{on} et une constante cinétique de dissociation k_{off} , on peut calculer la vitesse d'élongation d'un filament dont l'extrémité en croissance est libre :

$$v = \delta [Ck_{\text{on}} - k_{\text{off}}] \quad (3.10)$$

A l'équilibre, la vitesse d'élongation est nulle et on a :

$$C_C = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (3.11)$$

L'équation (3.8) permet de pressentir l'effet de l'application d'une charge au filament, diminuant k_{off} et augmentant k_{on} mais ne permet pas de quantifier cet effet. Pour cela, il est nécessaire d'avoir recours à des modèles mécanistiques.

3.8 Modèles mécanistiques

3.8.1 Le modèle du *Brownian ratchet*

George Oster et son groupe [Peskin et al., 1993] furent les premiers à proposer un mécanisme de génération de force par croissance de filaments autoassemblés. Comme son principe repose sur les fluctuations thermiques de la charge à déplacer, il a été appelé *Brownian ratchet*, ou cliquet Brownien, en référence à la machine imaginée par Feynman et al. [1963] qui permet, à partir des fluctuations thermiques d'un gaz, de produire un mouvement dirigé à condition qu'il existe une asymétrie énergétique dans le système. Dans cette machine imaginaire, une roue à cliquet crée cette asymétrie. Dans notre cas, l'asymétrie provient du potentiel chimique qui donne un sens préférentiel à la réaction de polymérisation (cf. paragraphe 3.7.1).

Le modèle de Peskin et al. se place dans la situation schématisée FIGURE 3.15 d'un filament rigide et incompressible fixement ancré à une extrémité et polymérisant à son autre extrémité contre une charge soumise à l'agitation thermique qui la fait fluctuer horizontalement. A chaque fois que l'excursion de la charge vers la droite est supérieure à δ , un monomère peut s'insérer au bout du filament, d'où l'asymétrie du mécanisme.

On considère la charge comme un objet de coefficient de diffusion D . Dans un régime où la charge exerce une force négligeable sur le filament, la réaction est seulement limitée par la diffusion de cet objet et le cliquet est dit parfait. Le temps pour la charge de s'écarter d'un pas δ est donné par l'expression de diffusion à 1D : $t_\delta = \frac{\delta^2}{2D}$. Dès que la charge s'est écartée de δ un monomère peut s'insérer. La vitesse d'élongation est donc :

$$v = \frac{\delta}{t_\delta} = \frac{2D}{\delta} \quad (3.12)$$

En pratique, les objets pouvant exercer une force sur un filament d'actine ont un coefficient de diffusion de l'ordre du $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Cela donnerait $v \sim 1 \text{ mm/s}$, ce qui est très grand devant la vitesse de polymérisation en solution (typiquement $1 \mu\text{m/s}$). Ce régime n'est donc jamais observé et on se situe

toujours dans un régime limité par la réaction.

Dans ce cas, la vitesse d'élongation ne dépend plus du coefficient de diffusion de la charge et devient :

$$v = \delta [Ck_{\text{on}}P_{x>\delta} - k_{\text{off}}] = \delta \left[Ck_{\text{on}} \exp\left(-\frac{F\delta}{k_{\text{B}}T}\right) - k_{\text{off}} \right] \quad (3.13)$$

On retrouve l'expression (3.10) de la vitesse en solution à ceci près que le taux de polymérisation est pondéré par un facteur $P_{x>\delta} = \exp\left(-\frac{F\delta}{k_{\text{B}}T}\right)$ exprimant la probabilité d'une excursion de la charge vers la droite suffisamment grande au moment de l'insertion du monomère. D'un point de vue mécanique, $P_{x>\delta}$ peut aussi être vu comme la probabilité que l'agitation thermique confère suffisamment d'énergie au monomère pour qu'il puisse effectuer un travail $F\delta$ en s'insérant à l'extrémité du filament. En revanche le taux de dépolymérisation n'est pas affecté par la charge. Lorsque la vitesse d'élongation s'annule, on retrouve l'expression (3.9) de la *stall force*.

Le profil vitesse-force traduisant l'efficacité de la conversion d'énergie présente une allure convexe caractéristique (FIGURE 3.16). On retrouve la propriété qu'une grande force appliquée peut induire la dépolymérisation du filament. La *stall force* a une valeur de 5 pN environ.

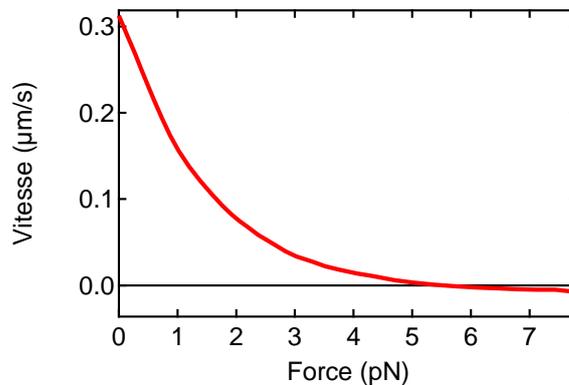


FIGURE 3.16 – Profil vitesse-force d'un filament en croissance contre une charge obtenu par le modèle du *Brownian ratchet* avec les paramètres suivants : $k_{\text{on}} = 11.3 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1.6 \text{ s}^{-1}$ et $C = 10 \mu\text{M}$. D'après [Peskin et al., 1993].

3.8.2 Le modèle du *Brownian ratchet* élastique

La principale critique qu'on peut adresser au *Brownian ratchet* est de ne pas tenir compte des fluctuations à l'échelle du filament, qui compte tenu de sa taille, sont sans doute aussi grandes que celle de la charge. Le groupe de George Oster [Mogilner and Oster, 1996] examina donc un autre cas idéal dans lequel le filament est toujours fixement ancré à une extrémité, mais possède maintenant un module élastique fini qui le rend sensible aux fluctuations thermiques alors que la charge est maintenant consi-

dérée comme stationnaire. Seul le mode de fluctuation en flexion est considéré (FIGURE 3.17). Lorsque le filament fléchit suffisamment pour libérer un espace de taille δ entre lui et le mur, un monomère peut s'insérer. Le filament relaxe alors l'énergie de courbure excédentaire acquise avec cette nouvelle sous-unité en exerçant sur la charge une force assimilable à celle d'un ressort de constante

$$k = \frac{4\lambda_p k_B T}{L^3 \sin^2 \theta} \quad (3.14)$$

où L est la longueur du filament et θ l'angle qu'il fait avec l'horizontale à son point d'ancrage.

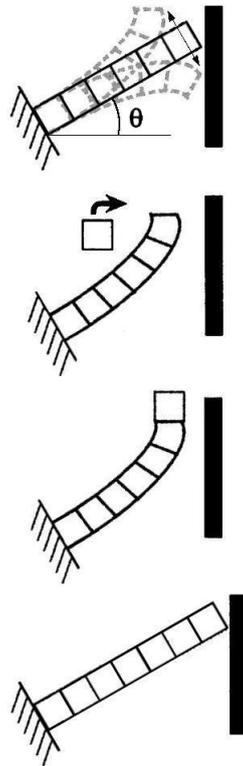


FIGURE 3.17 – Modèle du *Brownian ratchet* élastique de génération de force par un filament en croissance. Adapté de [Theriot, 2000].

Les ingrédients physiques de ce modèle étant les mêmes que le *Brownian ratchet*, il n'est pas étonnant que la vitesse d'élongation s'écrive de la même façon :

$$v = \delta \cos \theta \left[C k_{\text{on}} P_{x > \delta \cos \theta}(F, \theta, L, \lambda_p) - k_{\text{off}} \right] \quad (3.15)$$

à la différence qu'il n'existe pas d'expression analytique pour $P_{x > \delta \cos \theta}(F, \theta, L, \lambda_p)$.

La résolution numérique montre que v est maximale lorsque le filament forme un angle θ non nul par rapport à la charge. En effet, plus le filament est incliné par rapport à la charge, plus l'espace $\delta \cos \theta$

à créer pour l'insertion d'un monomère est faible et le coût énergétique de flexion diminue. Mais le déplacement de la charge après relaxation diminue également, ce qui explique l'existence d'un optimum.

Le profil vitesse-force est dépendant des nouveaux paramètres introduits. Avec des valeurs présentées par Mogilner and Oster comme typiques du lamellipode (distance de l'extrémité libre du filament au premier point de branchement $L = 30nm$, $\lambda_p = 1 \mu m$), l'angle θ optimal est 48° . A cette valeur de θ , on obtient le profil de la FIGURE 3.18. Celui-ci a la même allure convexe qu'avec le modèle du *Brownian ratchet* simple mais présente à faible force une zone de vitesse indépendante de la charge.

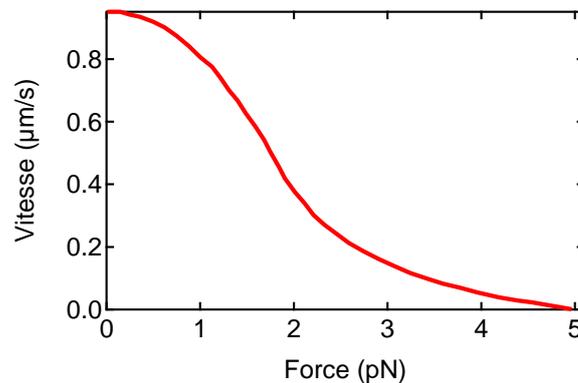


FIGURE 3.18 – Profil vitesse-force pour un filament obtenu par le modèle du *Brownian ratchet* élastique avec les paramètres suivants : $k_{on} = 11 \mu M^{-1}.s^{-1}$, $k_{off} = 1 s^{-1}$ et $C = 45 \mu M$. D'après [Mogilner and Oster, 1996].

Une amélioration du modèle a été proposée pour lui donner plus de pertinence par rapport aux observations expérimentales [Mogilner and Oster, 2003]. Il prend en compte le fait que les filaments sont vraisemblablement nucléés sur la membrane cellulaire par les protéines nucléatrices. Durant cette phase de nucléation, les filaments sont attachés à la charge et produisent une force de friction qui s'oppose au mouvement. Puis ils se détachent et peuvent fluctuer donc participer à la génération de force, d'où le nom de *Brownian ratchet* élastique attaché. Ce raffinement apporté au modèle ne fait que diminuer l'efficacité du moteur, mais ne change pas son mécanisme. La forme du profil vitesse-force est donc inchangée.

3.8.3 Le modèle entropique

Les deux modèles précédents considèrent l'ancrage du filament comme fixe. Or, comme il a été décrit au paragraphe 3.2.4, certaines structures comme le lamellipode peuvent être très souples et les fluctuations d'orientations des filaments autour de leur point d'ancrage peuvent être non négligeables. Nous avons donc étudié au LCMD un troisième cas limite dans lequel un filament rigide est libre de fluctuer par agitation thermique autour de son point d'ancrage et avons montré comment ce système

pouvait générer une force [Brangbour et al., 2011].

En l'absence de charge (FIGURE 3.19a), le filament est totalement libre de fluctuer et son extrémité libre peut se déplacer (à trois dimensions) sur une demi-sphère de rayon L . Le nombre de configurations orientationnelles est $\Omega = 2\pi$.

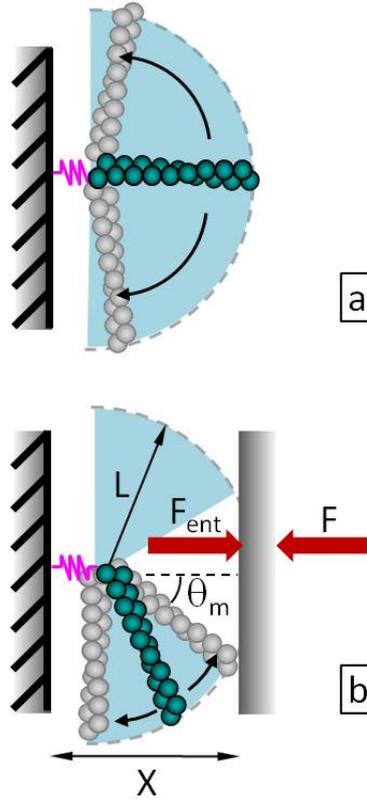


FIGURE 3.19 – Modèle de génération entropique de force par perte de liberté orientationnelle. En bleu est représentée la projection à 2D du volume dans lequel le filament peut fluctuer.

En présence d'une charge, le filament se trouve confiné (FIGURE 3.19b), ce qui génère une force d'origine entropique. En effet, le nombre de configurations orientationnelles accessibles diminue et devient :

$$\Omega = \int_0^{2\pi} d\phi \int_{\theta_m}^{\pi/2} = 2\pi \cos \theta_m = 2\pi \frac{X}{L} \quad (3.16)$$

L'expression de l'énergie libre de Helmholtz $\mathcal{F} = -k_B T \ln \Omega$ permet de calculer la force exercée sur la charge :

$$f = -\frac{\partial \mathcal{F}}{\partial X} = \frac{k_B T}{X} \quad (3.17)$$

Ce modèle présente deux caractéristiques essentielles. D'abord, la force ne dépend pas de la longueur du filament car la perte de configurations orientationnelles due à la présence de la charge est la même quelle

que soit la taille du filament. Ensuite la vitesse d'élongation n'est pas affectée par la charge : en moyenne l'extrémité du filament n'est pas en contact avec la charge et la vitesse d'élongation est la même qu'en solution (expression (3.10)).

La conséquence de ces deux caractéristiques est que la vitesse d'élongation du filament et la vitesse de la charge sont décorréliées. La charge possède une vitesse non nulle parce que le nombre de filaments en cours de polymérisation venant de la partie arrière du lamellipode qui l'atteignent augmente au cours du temps. La force exercée par la charge se répartit de façon égale sur les N filaments considérés comme indépendants : $F = N(t) \frac{k_B T}{X}$. Si F est constante au cours du temps, la vitesse de la charge est simplement :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dN}{dt} \frac{k_B T}{F} \quad (3.18)$$

Les trois modèles mécanistiques qu'on vient de présenter peuvent paraître dérangeants par leur degré de simplification. Mais ils permettent d'envisager de façon intuitive un phénomène de transduction entre énergie de polymérisation et travail mécanique qui reste difficile à concevoir, même si la thermodynamique prédit qu'il est possible.

3.8.4 Passage à N filaments

Dans le modèle entropique, les filaments sont indépendants et le passage de 1 à N filaments ne pose pas de problème. Pour un mécanisme de type *Brownian ratchet*, ce passage est moins immédiat. Pour extrapoler le modèle de Peskin et al. [1993] à une population de N filaments parallèles et alignés polymérisant contre une charge, on remarque que pour repousser la charge d'une distance δ vers la droite, le travail à produire $F\delta$ est inchangé. Le travail moyen à produire par filament est donc $\frac{F\delta}{N}$. Cette description est souvent interprétée en disant que la charge est *partagée* par les N filaments. L'expression de la vitesse devient :

$$v = \delta \left[C k_{\text{on}} \exp\left(-\frac{F\delta}{N k_B T}\right) - k_{\text{off}} \right] \quad (3.19)$$

Notons que Hill and Kirschner [1982] avaient déjà calculé cette valeur de la vitesse pour N filaments des arguments thermodynamiques. La *stall force* de ce système vaut maintenant N fois la *stall force* d'un seul filament.

Mais cette situation où tous les filaments sont rigoureusement alignés semble peu réaliste et les filaments sont toujours, dans une certaine mesure, décalés. Comme le remarquent Tsekouras et al. [2011], en faisant tendre le pas de temps d'observation des filaments vers zéro on peut toujours se ramener à une situation où un seul filament à la fois produit du travail contre la charge. Ce filament est véritablement *en*

contact avec la barrière alors qu'un grand nombre de filaments sont *très proches*. Ce modèle est dit sans partage de charge par les filaments. Des simulations numériques dans ce cadre ont permis à van Doorn et al. [2000] de retrouver la valeur de la *stall force* donnée par la thermodynamique et de retrouver un profil vitesse - force semblable aux expériences de Dogterom and Yurke [1997] sur les microtubules.

Schaus and Borisy [2008] ont examiné dans quelle mesure les filaments peuvent se répartir la charge qui leur est appliquée. Trois mécanismes sont identifiés :

- (i) La distribution d'orientations des filaments qui crée une distribution de distances entre les filaments et la barrière. L'avancée de la barrière par addition d'un monomère à l'extrémité de chaque filament est égale à une fraction de la taille d'un monomère et dépend de l'orientation de ce filament (partage dit fractionné) ;
- (ii) La flexibilité de la barrière qui augmente le nombre de filaments en contact avec elle (partage dit local) ;
- (iii) La flexibilité des filaments (partage dit simultané).

Un modèle analytique ne suffit plus dans ces géométries complexes pour prédire le comportement du système et des simulations numériques sont réalisées.

3.9 Généralisation à des géométries complexes

3.9.1 Simulations numériques

Dans les expériences de mesure de force réalisées jusqu'à présent, le nombre de filaments impliqués est grand et la structure est trop complexe pour dégager l'effet seul de l'addition de nouveaux monomères à l'extrémité de filaments en croissance. Paradoxalement, une petite population de filaments en croissance repoussant une barrière est une situation assez simple à modéliser numériquement. De nombreuses simulations ont donc été réalisées pour tenter de mieux comprendre l'interaction entre des filaments en croissance et une paroi qu'ils repoussent.

Par rapport aux modèles analytiques exposés section 3.8.4 qui se placent dans une situation de champ moyen où tous les filaments sont indépendants et identiques, les simulations numériques présentent l'intérêt d'intégrer un certain degré de coopérativité et de variabilité entre les filaments. La plupart font l'hypothèse d'une structure dendritique (c'est à dire arborescente) du cytosquelette d'actine où les nouveaux filaments sont nucléés par branchement grâce à une protéine de type Arp2/3.

Les travaux pionniers de Carlsson [2001] montrent qu'une simulation stochastique de type Monte-Carlo permet de recréer un réseau dont la structure est très proche du lamellipode et capable de propulser

une barrière à une vitesse comparable à celles observées *in vitro*. Un traitement plus rigoureux impliquant la résolution d'une loi de vitesse pour chaque filament aboutit à un résultat semblable [Carlsson, 2003], démontrant la pertinence de la simulation de Monte-Carlo pour la modélisation du cytosquelette d'actine.

Ces travaux mettent en évidence un effet surprenant. Le fait que Arp2/3 soit souvent située très près de la membrane conduit à l'hypothèse que le taux de branchement est proportionnel au nombre de filaments en contact avec la barrière (régime autocatalytique). Le fait d'augmenter la force exercée sur le réseau augmente le nombre de filaments en contact avec la barrière et donc le taux de branchement. La vitesse d'élongation est donc peu affectée puisque la force par filament est sensiblement constante. Cet effet pourrait expliquer la forme concave du profil de force observé par Parekh et al. [2005] ou Prass et al. [2006].

Par suite, de nombreuses études numériques se sont appliquées à faire varier la concentration de Arp2/3 et d'autres protéines régulatrices et à observer l'effet sur la densité de filaments. Ces études sont ici laissées de côté pour se concentrer sur l'interaction entre l'extrémité des filaments en croissance et la barrière.

Il semble naturel de considérer une distribution d'orientation des filaments. Cependant, dans les simulations de Schaus and Borisy cette distribution, bien que totalement aléatoire initialement, se resserre quand on laisse le système évoluer sous l'effet de la charge. Les filaments se réorientent préférentiellement à 35° par rapport à la normale à la barrière (la moitié de l'angle de branchement par Arp2/3), en accord avec les observations *in vivo* dans les lamellipodes. Le partage local n'est pas critique pour les performances du réseau alors que le partage simultané améliore grandement les performances dans une certaine mesure : des filaments trop flexibles sont incapables de supporter la charge.

D'autres études numériques proposent une interprétation différente du mécanisme de génération de force. La barrière peut être vue comme une source de nouveaux filaments d'actine qui dépolymérisent par la suite en s'éloignant de cette source [Lee and Liu, 2008]. On a donc un gradient de concentration de filaments. En supposant qu'il existe une interaction répulsive entre la barrière et l'actine, ce gradient repousse la barrière vers l'avant. Ce mécanisme a été nommé auto-diffusiophorèse par les auteurs [Lee and Liu, 2009]. Les effets de volume exclu pourraient jouer un rôle dans cette interaction répulsive [Schreiber et al., 2010]. Ces effets apparaissent car les filaments doivent garder un certain volume libre autour d'eux pour fluctuer sans s'intersecter, ce qui engendre un gonflement du gel d'actine qui repousse la barrière.

3.9.2 Modèles mésoscopiques

On peut néanmoins remarquer que le modèle développé par Schreiber et al. [2010] sur la base de simulations numériques se rapprochent de l'analyse mésoscopique faite par Gerbal et al. [2000] pour décrire la propulsion de *Listeria* par une comète d'actine. Ce modèle prend en compte les propriétés mécaniques du gel d'actine et la répartition des contraintes autour de l'objet propulsé. Celui-ci est "pincé" dans un gel d'actine, et la compétition entre la force élastique de compression à l'arrière de l'objet et les forces de friction sur ses côtés permet de prévoir avec une bonne précision les résultats expérimentaux.

En propulsant des vésicules lipidiques déformables à la place de billes, Giardini et al. [2003] mettent en évidence la complexité de l'interaction entre la comète d'actine et l'objet propulsé. La déformation des vésicules est la conséquence de la répartition des forces à leur surface, ce qui permet de les quantifier.

3.10 Vérification expérimentale des modèles

De manière générale, la configuration dans laquelle la polymérisation des filaments d'actine est envisagée dans les modèle analytiques et les simulations numériques est encore très éloignée de celle observée expérimentalement. On expose ici les tentatives qui ont été faites pour relier les observations expérimentales aux modèles.

3.10.1 Test du *Brownian ratchet* sur les comètes

De nombreux auteurs ont cherché à faire varier les fluctuations des objets propulsés par une comète d'actine pour observer des effets prévus par le *Brownian ratchet*. Ainsi, Cameron et al. [1999] et Wiesner et al. [2003] ont fait varier le diamètre des billes propulsées. Dans le cadre du *Brownian ratchet*, on s'attendrait à voir varier la vitesse de propulsion de façon proportionnelle au coefficient de diffusion de ces billes. Aucune différence importante de vitesse n'est remarquée pour des billes dont le diamètre varie entre 0.2 et 0.9 μm .

Dans une approche légèrement différente, Shaevitz and Fletcher [2007] mesurent les fluctuations de billes de même diamètre durant leur propulsion dans des géométries plus ou moins confinées où leur coefficient de diffusion est modifié. Ils constatent ainsi que la vitesse des billes augmente avec l'amplitude de leurs fluctuations. Ce résultat est cohérent avec le *Brownian ratchet*, mais ne constitue qu'un indice indirect que c'est bien le mécanisme qui est en jeu dans la génération de force.

La complexité de la structure de la comète d'actine est certainement à la base de la contradiction entre ces deux approches.

3.10.2 Mesures de forces sur une assemblée de filaments

Signalons enfin deux études qui se placent dans une configuration très proche de celle des modèles et parviennent à étudier une petite population de filaments indépendants.

Greene et al. [2009] emploient la technique du *Surface Force Apparatus* (SFA) développée par Israelachvili [1973] pour appliquer une force à un ensemble de quelques centaines de milliers de filaments parallèles polymérisant en une brosse régulière, dans un milieu constitué seulement d'une très forte concentration d'actine, sans aucune protéine de régulation. Mais le SFA se révèle inadapté à la mesure simultanée de la vitesse d'élongation et c'est l'élasticité des filaments qui est sondée plutôt que le mécanisme de génération de force.

Footer et al. [2007] sont parvenus à réduire le nombre de filaments sondés à moins de 10 en utilisant un acrosome. Cette structure biologique est capable de nucléer un faisceau d'environ 8 filaments d'actine. Le faisceau ainsi obtenu est plus gros et plus rigide qu'un filament unique et peut être manipulé avec une pince optique. Il est maintenu à proximité d'une paroi, dans une configuration ainsi très proche du *Brownian ratchet*. Lorsque le faisceau atteint cette paroi, l'acrosome est écarté du centre de la pince optique, créant une force sur les filaments croissant à mesure que ceux-ci polymérisent, jusqu'à l'obtention d'un plateau de valeur F_{\max} . Cette force maximale étant proche ou supérieure à la force de flambement d'un seul filament F_{buck} calculée théoriquement par l'expression (3.9), il est impossible de conclure si la *stall force* a été atteinte ou si les filaments continuent de croître de façon courbée.

En revanche, lorsque la concentration en actine est réduite, F_{\max} est alors 3 à 20 fois inférieure à F_{buck} et sensiblement égale à la *stall force* d'un filament. Les auteurs élaborent un modèle sans partage de force pour expliquer leurs résultats. La charge ne serait en fait supportée que par un seul filament à la fois. Mais dès qu'il est en contact de la charge, il se met à dépolymériser jusqu'à ce qu'un autre filament plus petit rentre à son tour en contact avec la charge.

3.11 Conclusion

Dans ce chapitre introductif on s'est attaché à décrire la structure dynamique du cytosquelette. Ses propriétés mécaniques lui permettent de remplir des rôles différents au sein de la cellule tandis que ses propriétés d'autoorganisation couplées à sa capacité à se maintenir en permanence hors de l'équilibre assure la génération de forces dirigées exercées sur de grandes échelles d'espace et de temps. On a mis en lumière la diversité de topologies et le lien avec le type de force qu'elles peuvent générer. Ce couplage entre la biochimie et la mécanique est fondamental et on s'aperçoit vite que pour comprendre le méca-

nisme de génération de force par la polymérisation d'actine, il est nécessaire d'avoir un système dont on maîtrise parfaitement la biochimie. Ceci n'est possible qu'avec un ensemble de protéines dont on connaît à tout instant et à tout endroit la concentration et les interactions entre elles. Il faut pouvoir connaître la concentration réelle d'actine capable de polymériser dans la zone de contact. En effet, quelle que soit la géométrie de la structure qu'on considère, le véritable moteur de la génération de force est l'interaction entre l'extrémité des filaments en croissance et la barrière, que tentent d'appréhender les différents modèles théoriques. Pour véritablement sonder cette interaction, on a ainsi besoin d'un système dont on maîtrise la géométrie, afin de s'affranchir des effets de branchement, de cappe, de dépolymérisation et de réorganisation du réseau qui nuisent à l'analyse de nombreuses études expérimentales.

On a de plus montré que la polymérisation d'actine peut engendrer une force. Des arguments thermodynamiques montrent que l'énergie libérée est suffisante pour générer cette force. Les mesures expérimentales sont cohérentes avec les valeurs de forces calculées. Mais le mécanisme physique qui rend possible ce phénomène reste à élucider.

Mesure de force dans une géométrie contrôlée

4.1 Introduction

On a montré au chapitre précédent la faible quantité, à travers la littérature, d'études expérimentales sur la force exercée par des filaments d'actine contre une paroi. De telles expériences ont pourtant été réalisées avec succès sur les microtubules [Dogterom and Yurke, 1997]. Mais les propriétés particulières des filaments d'actine, plus fins et beaucoup moins rigides, rend l'élaboration d'un dispositif expérimental de mesure bien plus ardue. Ce défaut de résultats expérimentaux empêche la compréhension du mécanisme par lequel la seule polymérisation d'actine peut générer une force.

Nous avons réussi à contourner les problèmes rencontrés jusqu'à présent dans les mesures sur les filaments d'actine et à élaborer un système expérimental permettant d'appliquer des forces à une population de filaments polymérisant dans une géométrie maîtrisée. Ce système a été développé par Coraline Brangbour [Brangbour, 2008]. Il est basé sur l'utilisation de billes magnétiques à la surface desquelles est greffée une protéine, la gelsoline, qui sert d'amorce à la polymérisation de filaments d'actine. Aucune forme de branchement n'est observée dans ce système. Les filaments forment une population d'individus indépendants et non un réseau complexe sujet à différentes formes de réorganisation. La concentration d'actine est connue dans toute la zone d'élongation des filaments et il n'y a pas de phénomène de séquestration de protéines.

Nous avons amélioré ce dispositif dans le but de contrôler l'amplitude des fluctuations d'orientation des filaments. On exposera dans ce chapitre les méthodes développées pour caractériser ce nouveau système et qui permettent d'en maîtriser finement l'organisation.

Les billes magnétiques servent à la fois de support aux filaments et de paroi que l'on oppose à leur croissance. On peut donc soumettre avec ces objets une population de filaments d'actine à des forces contrôlées. La gamme de force accessible correspond à la force typique produite par la polymérisation de l'actine. On montrera dans ce chapitre que la géométrie de ce système est bien adaptée pour sonder l'interaction entre des filaments d'actine en croissance et une charge appliquée.

4.2 Conditions expérimentales

4.2.1 Protéines

Toutes les protéines utilisées au cours de cette thèse ont été fournies et préparées par l'équipe de Marie-France Carlier du Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS) de Gif-sur-Yvette.

L'actine est purifiée à partir de muscle squelettique de lapin selon une procédure standard [Spudich and Watt, 1971] puis isolée sous sa forme monomérique actine-G-Ca-ATP par chromatographie sur une colonne Superdex-200 dans un tampon G (5 mM Tris HCl pH 7.8, 0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT, 0.01 % NaN₃) et conservée à 0°C dans ce même tampon. Pour certaines expériences, on utilise de l'actine marquée au pyrène selon le protocole décrit par Kouyama and Mihashi [1981]; ainsi que de l'actine marquée par le fluorophore Alexa488. Dans toutes les expériences réalisées avec de l'actine fluorescente, la fraction de monomères marqués est de 10%.

La gelsoline recombinante humaine est exprimée dans *E Coli* selon un protocole décrit par Pantaloni et al. [2000] puis conservée à 13 µM dans un tampon Tris (20 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.01 % NaN₃) à -80°C.

La fascine recombinante humaine est elle aussi exprimée dans *E Coli* [Ono et al., 1997] et conservée à 90 µM dans un tampon Tris (50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) à -80°C.

4.2.2 Greffage de la gelsoline sur les billes magnétiques

Pour être fixée sur les billes magnétiques recouvertes de streptavidine, la gelsoline est biotinylée au moyen de sulfo-NHS-LC-LC-biotine qui réagit avec les groupements NH₂ libres de la protéine. Cette molécule présente entre la fonction réactive sulfo-NHS et la biotine une chaîne carbonée (LC-LC) d'une

longueur de 3.05 nm. Elle confère une grande liberté orientationnelle à la gelsoline une fois greffée sur les billes.

Avant cette étape de biotinylation, les molécules de Tris du tampon de conservation de la gelsoline qui possèdent aussi un groupement NH_2 doivent être éliminées par une dialyse contre du tampon PBS (TABLE 4.1). Puis la gelsoline est incubée 45 minutes à température ambiante avec la sufo-NHS-LC-LC-biotine à 1 mM. Le ratio biotine : gelsoline est de 16:1. Dans ces conditions, la réaction est quasiment totale et optimise le rendement du couplage de la gelsoline biotinylée avec la streptavidine sans dénaturer exagérément la gelsoline [Brangbour, 2008].

Tampon PBS	Phosphate pH 7.4	10 mM
	KCl	2.7 mM
	NaCl	137 mM
	EGTA	1 mM
	NaN_3	0.01 %
Tampon greffage	Tris HCl pH 7.5	5 mM
	F127	0.5 %
	NaN_3	0.01 %

TABLE 4.1 – Compositions des tampons utilisés pour les différentes étapes de greffage de la gelsoline sur les billes magnétiques.

Après une seconde dialyse contre du tampon PBS pour éliminer les biotines n'ayant pas réagi, la gelsoline biotinylée est laissée réagir avec les billes préalablement lavées sur aimant 3 fois en tampon de greffage (TABLE 4.1). Après 15 minutes de réaction, les billes sont incubées 5 min en tampon S (TABLE 4.2) pour saturer de biotine les sites streptavidine et lavées 5 fois dans ce même tampon.

Deux lots différents de billes magnétiques ont été utilisés : des billes de diamètre environ 1 μm (Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Life Technologies) et des billes de diamètre 3 μm environ (Dynabeads M-270 Streptavidin, Life Technologies). Par la suite, nous les appellerons simplement billes de 1 μm et billes de 3 μm .

Pour greffer 10 μg de billes de 1 μm (TABLE 4.5), c'est à dire 1 μL de billes à 1% en masse, on introduit 11 pmol de gelsoline biotinylée. Le rendement de cette réaction est environ 1% (*cf.* paragraphe 4.6.3). On obtient ainsi 7000 gelsolines fonctionnelles par bille, soit une densité surfacique de 1800 gelsolines/ μm^2 . Pour obtenir une densité équivalente avec les billes de 3 μm , soit environ 50000 gelsolines fonctionnelles par bille, on introduit 1.5 pmol de gelsoline biotinylée pour 10 μg de billes.

Les billes ainsi greffées avec la gelsoline sont conservées à une concentration de 0.5% en tampon S à 0°C et utilisées dans les 24 heures qui suivent. Chaque greffage de billes est réalisé avec un nouvel aliquot de gelsoline fraîchement biotinylée.

4.2.3 Conditions biochimiques

Toutes les expériences sont réalisées avec une concentration d'actine finale $C_0 = 2 \mu\text{M}$ et une concentration massique finale de 0.01 % de billes de $1 \mu\text{m}$ ou 0.025 % de billes de $3 \mu\text{m}$.

Avant chaque nouvelle expérience, l'actine-Ca est convertie en actine-Mg plus instable par ajout de 0.02 mM de MgCl_2 et 0.25 mM d'EGTA. Ce dernier complexe préférentiellement le Calcium, ce qui déplace l'équilibre $\text{Actine} - \text{Ca} \rightleftharpoons \text{Actine} - \text{Mg}$ vers la droite.

Actine		2 μM
Tampon G	Tris HCl pH 7.8	5 mM
	CaCl_2	0.2 mM
	ATP	0.2 mM
	DTT	1 mM
	F127	0.5 %
	NaN_3	0.01 %
Tampon S	idem Tampon G	
	+ Biotine	0.5 mM
Tampon F	idem Tampon G	
	+ KCl	40 mM
	+ MgCl_2	0.6 mM

TABLE 4.2 – Conditions biochimiques lors des expériences de polymérisation de l'actine.

Toutes les expériences sont réalisées dans le tampon de polymérisation ou tampon F (TABLE 4.2) dont on détaille ci-après le rôle des principaux constituants.

Chaque monomère d'actine fixe une molécule d'ATP. Son hydrolyse joue un rôle important dans le processus de *treadmilling* qui est absent de nos expériences puisque les filaments d'actine sont cappés par leur extrémité barbée. Cependant, la présence d'un nucléotide hydrolysé ou non a des conséquences sur les propriétés mécaniques des filaments [Isambert et al., 1995].

Le DTT est un réducteur puissant. Il joue donc le rôle d'antioxydant pour les protéines du milieu.

Le pluronique F127 est un tensioactif non ionique à base d'oxyde de polyéthylène (PEO) et d'oxyde de polypropylène (PPO). Il permet une bonne solubilisation des billes magnétiques, les empêche d'adhérer entre elles et aux parois des tubes qui les contiennent. Il n'a pas d'effet observable sur les propriétés de l'actine.

L'azide de sodium NaN_3 est un conservateur qui empêche la croissance des bactéries dans le milieu en bloquant leur chaîne respiratoire.

Le tampon F contient en plus du tampon G une concentration importante de sels, qui écranterait fortement la répulsion électrostatique entre monomères d'actine et déclenche ainsi la polymérisation. Notons que pour éviter l'agrégation irréversible des billes magnétiques entre elles, les concentrations en sels

du tampon F ont été fortement diminuées par rapport aux concentrations physiologiques classiquement utilisées.

Conversion en	MgCl ₂	0.02 mM
Actine-Mg	EGTA	0.25 mM
Activation de la	KCl	40 mM
polymérisation	MgCl ₂	0.6 mM

TABLE 4.3 – Conditions expérimentales pour l’activation de l’actine.

Dans ces conditions, les constantes cinétiques ont été mesurées en spectroscopie de fluorescence avec de l’actine marquée pyrène selon le protocole décrit par Brangbour [2008] et inspiré de [Ditsch and Wegner, 1994]. Elles sont rassemblées TABLE 4.4. Les filaments d’actine s’allongent par le bout pointu donc seules les valeurs à cette extrémité sont intéressantes. Pour limiter la nucléation de l’actine en solution par l’extrémité barbée, il est nécessaire de se placer le plus près possible de la concentration critique à cette extrémité, d’où le choix d’une concentration en actine $C = 2 \mu\text{M}$.

La vitesse d’élongation des filaments d’actine en solution, établie au paragraphe 3.7.2, vaut $v = \delta(k_{\text{on}}C - k_{\text{off}})$. Dans cette expression, la longueur d’une sous-unité δ prend en compte le fait qu’un filament est une double hélice. A chaque ajout d’un monomère de taille a à l’extrémité en croissance, le filament s’allonge de $\delta = a/2 = 2.7 \text{ nm}$. Dans les conditions où l’on se place, v vaut 0.42 nm s^{-1} .

Enfin, la connaissance de la concentration critique au bout pointu permet de calculer la *stall force* d’après l’expression (3.9).

	Bout pointu	Bout barbé
k_{on}	$0.12 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-
k_{off}	0.084 s^{-1}	-
C_C	$0.7 \mu\text{M}$	$0.3 \mu\text{M}$
v	0.42 nm s^{-1}	-
F_{stall}	1.6 pN	-

TABLE 4.4 – Résumé des constantes cinétiques et thermodynamiques mesurées, à partir desquelles sont calculées les valeurs de la vitesse d’élongation v et de la *stall force* F_{stall} .

4.3 Mesure de force et de distance

4.3.1 La machine de force

Pour appliquer des forces contrôlées à des filaments d'actine en croissance, nous utilisons un dispositif expérimental que nous appelons machine de force par chaînage magnétique [Dreyfus et al., 2009]. Cette technique développée au laboratoire permet de sonder les forces colloïdales s'exerçant entre des billes magnétiques. Son principe est le suivant : lorsqu'un champ magnétique est appliqué à une suspension de billes magnétiques, ces dernières se comportent comme des dipôles magnétiques induits. La minimisation des interactions dipolaires conduit à la formation de chaînes linéaires de billes au sein desquelles les billes ne sont pas au contact : un équilibre entre la force magnétique attractive et des forces répulsives les maintient à une distance bien définie les unes des autres. Ces forces répulsives peuvent être de plusieurs nature. Lorsque les billes sont suspendues dans un électrolyte simple de force ionique faible, la répulsion électrostatique à courte portée entre les charges de surface des colloïdes domine [Leal Calderon et al., 1994]. Ces forces peuvent aussi être de nature plus complexe et à plus longue portée. L'introduction de polymère permet de sonder la répulsion stérique entre les chaînes [Philip et al., 2003]. En greffant des brins d'ADN à la surface des billes, on peut sonder l'élasticité de ces molécules [Koenig et al., 2005; Li et al., 2010].

Lorsque des filaments d'actine en croissance sont greffés à la surface des billes, la force de répulsion peut donc être générée par la polymérisation des filaments. Ce système est donc parfaitement adapté pour appliquer des forces maîtrisées à des filaments d'actine en croissance. Plus précisément, la force magnétique qui s'exerce entre deux billes au sein d'une chaîne a pour expression [Zhang and Widom, 1995] :

$$F_{\text{mag}} = \mu_0 \frac{3\zeta(3)m(B,d)^2}{2\pi d^4} \quad (4.1)$$

où μ_0 est la perméabilité du vide, $\zeta(3) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^3} \approx 1.202$ et d est la distance centre à centre entre les billes. Le moment magnétique $m(B,d)$ des billes de rayon r s'écrit :

$$m(B,d) = \frac{4\pi r^3 \chi B}{3\mu_0 \left(1 - \frac{4}{3}\zeta(3)\chi \left(\frac{r}{d}\right)^3\right)} \quad (4.2)$$

La susceptibilité magnétique des billes χ est déduite d'une mesure d'aimantation telle que celle de la FIGURE 1 page 18.

Notons que le modèle élaboré par Zhang and Widom [1995] prend en compte l'influence sur chaque bille de toutes les autres billes au sein d'une chaîne de longueur infinie. En pratique, les chaînes

formées dans les expériences comptent entre 10 et 20 billes et sont donc sensibles aux effets de bords. Cependant, si l'on ne prend pas en compte les deux particules situées aux extrémités des chaînes, ces effets deviennent négligeables et on peut considérer la force entre toutes les billes comme constante et égale à l'expression (4.1) [Brangbour, 2008].

Finalement, la connaissance du champ magnétique B et la distance d entre les billes magnétiques permet de connaître la force appliquée aux filaments d'actine.

La mesure de cette distance est effectuée en temps réel par vidéomicroscopie. Pour cela, la platine motorisée d'un microscope inversé Nikon Eclipse TE-2000 a été modifiée pour accueillir deux bobines de Helmholtz pilotées par ordinateur pouvant créer des champs magnétiques de 0 à 100 mT (FIGURE 4.1 - gauche). Les chaînes de billes formées dans l'échantillon peuvent donc être imagées sous champ à l'aide d'un objectif à immersion à huile de grossissement $\times 100$ et d'ouverture numérique 1.25, et d'une caméra numérique Hamamatsu ORCA-ER. Ce système optique permet d'atteindre une résolution de 64 nm par pixel.

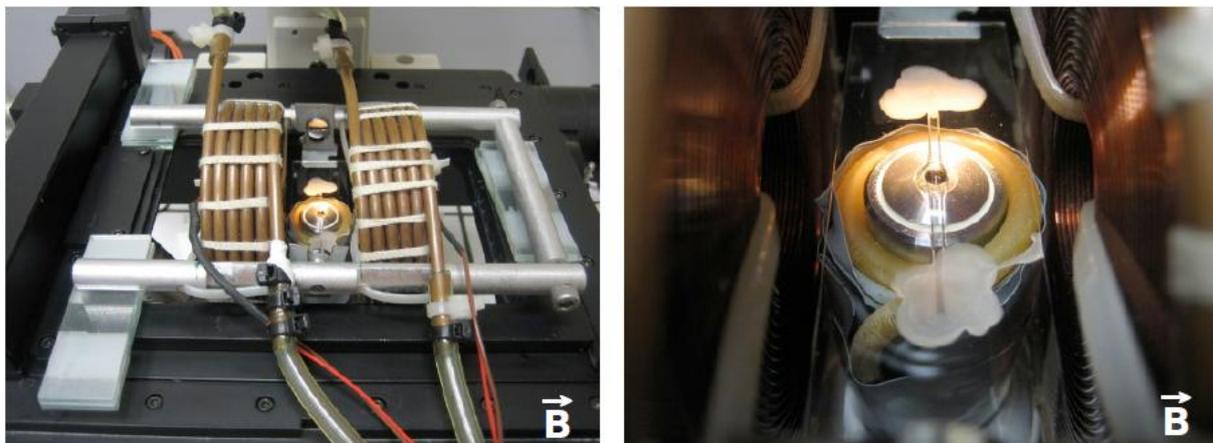


FIGURE 4.1 – *Gauche* : vue d'ensemble de la platine du microscope. Les bobines sont disposées de part et d'autre de l'objectif et sont encerclées d'un tuyau de cuivre dans lequel circule un liquide réfrigérant. *Droite* : échantillon dans un capillaire de verre maintenu sur l'objectif, lui aussi réfrigéré. Dans ces deux photos le champ magnétique créé est horizontal. *Photos extraites de [Brangbour, 2008].*

Les images des billes magnétiques sous champ sont analysées via un algorithme de *particle tracking* développé au laboratoire sous le logiciel NIS-Elements (Nikon) et inspiré de la méthode décrite par Crocker and Grier [1996] pour mesurer la distance entre les objets. Il consiste à réaliser un seuillage qui permet de reconnaître sur les images les disques correspondant aux billes. Puis la distance entre les centroïdes de ces disques est mesurée et analysée par la suite.

Deux types de mesures sont effectuées : (i) le suivi cinétique de la distance entre les billes sous charge appliquée constante lorsque des filaments d'actine polymérisent à leur surface ; (ii) l'évolution de

la distance entre les billes en réponse à une rampe de force courte dans le temps, qui permet de sonder la réaction mécanique de filaments de longueur donnée.

4.3.2 Suivi cinétique

Préalablement à chaque expérience, l'actine-Ca est transformée en actine-Mg puis mélangée avec les billes greffées gelsoline et le tampon F, ce qui déclenche la polymérisation. Cette étape correspond au temps t_0 de l'expérience. Le mélange est injecté dans un tube capillaire en verre de section 0.1×1 mm puis scellé à ses extrémités par de la cire liquide sur une lame de verre et transféré dans le montage d'observation au microscope (FIGURE 4.1 - droite). Cette manipulation prend quelques minutes. Une fois l'échantillon inséré dans le montage, les billes sédimentent en quelques dizaines de secondes au fond du capillaire.

L'échantillon est ensuite laissé reposer à champ magnétique nul jusqu'à ce que les filaments atteignent une longueur de 250 nm. Ce temps de repos a pour but d'éviter l'agrégation irréversible des billes à l'application du champ qui se produit souvent si les filaments à leur surface sont trop courts. En effet, la présence d'un électrolyte complexe avec notamment des protéines chargées et des ions divalents déstabilise (en termes d'interactions colloïdales) les billes qui peuvent s'agréger si on les approche trop près les unes des autres en appliquant un champ magnétique. Les filaments d'actine maintiennent les billes suffisamment éloignées pour empêcher ce phénomène.

En conséquence, le champ magnétique est appliqué à l'échantillon à $t_0 + 10$ min. Un faible champ (3 mT) suffit pour former des chaînes suffisamment longues en quelques dizaines de secondes. Une chaîne d'intérêt est ensuite choisie et la mesure de distance est effectuée toutes les 8 à 10 s. Chaque expérience correspond au suivi d'une unique chaîne. Comme les filaments s'allongent, les billes s'écartent au cours du temps. Si la mesure était réalisée à champ magnétique constant, d'après l'expression (4.1) la force à laquelle les filaments sont soumis diminuerait. Pour éviter ce phénomène, une boucle de rétroaction permet à chaque mesure de distance de corriger le champ magnétique créé par les bobines, maintenant ainsi la force appliquée aux filaments constante au cours du temps.

4.3.3 Mesures mécaniques

Pour une mesure mécanique, l'échantillon est préparé de la même façon que pour un suivi cinétique et soumis à un champ magnétique de 3 mT à $t_0 + 10$. Une fois les chaînes formées, le champ magnétique est abaissé à 1 mT jusqu'à ce que les filaments aient atteint la longueur désirée. La force magnétique créée par ce champ de 1 mT est suffisante pour maintenir la cohésion des chaînes de billes tout en ayant un effet sur la croissance des filaments quasiment négligeable.

Pour sonder les propriétés mécaniques des filaments, une rampe croissante puis décroissante de champ magnétique est appliquée à l'échantillon. A chaque valeur de champ, la distance entre les billes d'une chaîne est moyennée sur 30 images prises toutes les 100 ms. Un cycle complet de champ est réalisé en moins de 100 s. Pendant cette durée, les filaments peuvent croître de 40 nm au maximum (TABLE 4.4).

4.4 Modification du dispositif expérimental

L'ensemble des protocoles décrits jusqu'à présent ainsi que le dispositif expérimental utilisé ont en majeure partie été élaborés par Coraline Brangbour durant sa thèse [Brangbour, 2008]. Il apparaît dans ces conditions que les filaments d'actine s'orientent totalement librement autour de leur point d'ancrage, ce qui n'est pas souvent le cas *in vivo* dans les lamellipodes.

Pour le rendre plus proche d'une situation physiologique, nous avons fait évoluer ce système expérimental. Dans le but de modifier la géométrie et l'organisation des filaments sondés, on a ajouté de la fascine dans le milieu. Cette protéine regroupe les filaments parallèlement les uns aux autres en des câbles appelés faisceaux ou *bundles*. Dans cette situation, il se peut que des filaments poussant face à face soient eux aussi liés entre eux par la fascine, empêchant les billes de s'écarter normalement. Pour cette raison, des billes non greffées gelsoline, qu'on qualifiera par la suite de billes nues, sont introduites dans le système. On ne mesurera plus que la force exercée par des faisceaux contre des billes nues.

Les modifications apportées au dispositif expérimental pour rendre possible cette expérience sont décrites dans cette section.

4.4.1 Choix des billes

On a choisi pour cette expérience d'utiliser des billes de 3 μm plutôt que de 1 μm . Plusieurs raisons ont motivé ce choix :

- (i) On cherche à former des structures très rigides de faisceaux de filaments d'actine liés entre eux par la fascine. On s'attend donc à ce que ces faisceaux aient une résistance mécanique élevée. Les billes de 3 μm , contenant une plus grande quantité d'oxyde de fer magnétique, permettront de leur appliquer des forces plus grandes.
- (ii) Comme les billes de 3 μm sont beaucoup plus massives que celles de 1 μm , l'amplitude de leurs fluctuations thermiques est beaucoup plus faible, notamment dans la direction verticale z . Cette meilleure stabilité facilite le repérage des billes par l'algorithme de *particle tracking* : si les billes sortent légèrement du plan focal à cause des fluctuations, il est possible qu'il ne les détecte pas. Ceci est particulièrement vrai pour le repérage des billes marquées sur les images en fluorescence.

- (iii) Les faibles fluctuations des billes de 3 μm autorisent à les imager avec un plus grand temps de pose en microscopie de fluorescence, ce qui permet de visualiser la croissance d'actine marquée fluorescente à leur surface.
- (iv) La stabilité colloïdale des billes de 3 μm est meilleure : elles ont moins tendance à s'agréger de façon irréversible, ce qui améliore la précision des mesures.

4.4.2 Marquage fluorescent

Les billes nues ajoutées dans le système sont des Dynabeads M-270 Carboxylic Acid. Afin de les distinguer des billes couvertes de gelsoline, on les rend fluorescentes. Pour ce marquage, on utilise un fluorophore Alexa488 possédant une extrémité réactive hydroxylamine capable de former une liaison amide avec les groupes COOH des billes en présence de EDC et NHS comme catalyseurs de la réaction [Hermanson, 1996].

Pour réaliser cette réaction, 30 μL de billes à 0.3% suspendues dans un tampon PBS 10 mM, pH 7.4 contenant 3 mg/mL de EDC et 3 mg/mL de NHS sont mises en présence de 2 μL d'Alexa488 hydroxylamine à 2 μM dans le DMSO. Ce mélange est laissé incuber au moins 2 h sous agitation à 60°C. Les billes sont ensuite rincées 5 fois en tampon G et conservées à 0.3% à 4°C dans ce même tampon.

4.4.3 Nouveau protocole expérimental

Les échantillons sont préparés de la même façon qu'au paragraphe 4.3.2 en ajoutant 0.008% de billes marquées fluorescentes (soit une proportion d'environ 1 bille nue pour 3 billes gelsoline) et éventuellement 2 μM de fascine.

Avant chaque mesure de distance, une image en lumière fluorescente est réalisée, permettant de repérer l'emplacement des billes nues dans la chaîne analysée. Ainsi l'algorithme de *particle tracking* ne considère que les distances entre une bille nue et une bille gelsoline au sein de la chaîne. Cet algorithme mesure des distances centre à centre entre les billes. Pour en déduire des distances surface à surface, on soustrait la somme des rayons d'une bille nue et d'une bille gelsoline, soit 2990 nm (*cf.* paragraphe 4.6.1).

La boucle de rétroaction lors des expériences de suivi cinétique ne maintient la force magnétique constante qu'entre les couples {bille nue - bille gelsoline}. Pour s'affranchir des effets de bords, la bille située à chaque extrémité de la chaîne n'est pas prise en compte.

La FIGURE 4.2 montre une image typique obtenue au cours d'une expérience de suivi cinétique en présence de fascine. Le respect des contraintes énumérées ci-dessus conduisent le programme à ne tenir compte que des distance indiquées en rouge. Ici, le résultat est $d_{\text{moy}} = 3.29 \mu\text{m}$, soit une distance surface à surface $X_{\text{moy}} = 0.30 \mu\text{m}$.

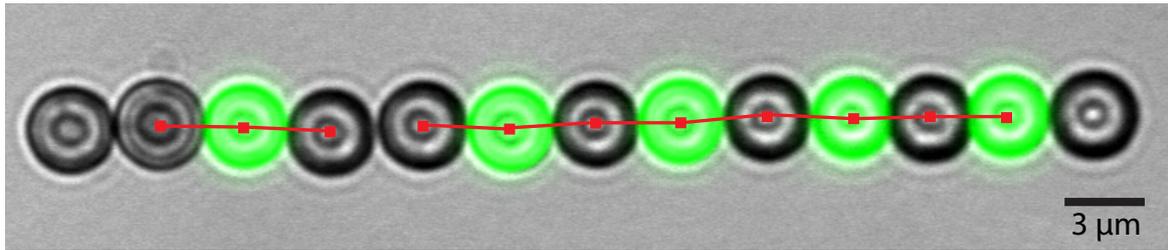


FIGURE 4.2 – Image composite en fausses couleurs d’une chaîne contenant un mélange de billes gelsoline (noires) et nues (vertes) de $3\ \mu\text{m}$. L’image est prise après 11 min de polymérisation d’actine en présence de fascine sous une force de $4.6\ \text{pN}$. Le programme calcule la moyenne des distances indiquées en rouge. On trouve $d_{\text{moy}} = 3.29\ \mu\text{m}$.

4.5 Évaluation de l’erreur de mesure

Dans les expériences avec la machine de force, tous les résultats obtenus découlent de la mesure de la distance entre les billes et de la force magnétique qui leur est appliquée. Il est donc nécessaire d’examiner les causes d’erreur sur ces deux paramètres pour en déduire l’erreur sur les résultats d’expériences. Pour pouvoir comparer entre elle les différentes sources d’erreur, elles seront toutes ramenées à une erreur sur la distance.

Une première source d’erreur est liée au dispositif de mesure de la distance en lui-même. Pour l’évaluer, l’expérience suivante a été réalisée : des billes magnétiques de $3\ \mu\text{m}$ sont immobilisées sur la paroi d’un capillaire en verre par l’addition d’une solution de $50\ \text{mM}$ de CaCl_2 . La distance entre deux billes séparées de quelques centaines de nanomètres est mesurée 10000 fois à champ magnétique nul. L’ensemble des valeurs mesurées présente une distribution gaussienne dont l’écart-type est assimilé à l’erreur de mesure. On trouve $\delta d_{\text{setup}} = 10\ \text{nm}$. Dans une chaîne, les billes sont séparées d’une distance minimum $d = 2r$. On en déduit une majoration de l’erreur valable pour les deux types de billes : $\frac{\delta d_{\text{setup}}}{d} \sim 0.3\%$. Le dispositif de mesure est donc très précis.

Une autre source d’erreur provient de la polydispersité en taille des billes. Toutes conditions égales par ailleurs, la distance centre à centre mesurée varie d’un couple de billes à l’autre à cause de ces petites variations de diamètre. La polydispersité des billes de $1\ \mu\text{m}$ est estimée en DLS à $\frac{\delta d_{\text{poly}}}{d} \sim 2\%$. Cette valeur n’a pas pu être évaluée pour les billes de $3\ \mu\text{m}$, trop grosses pour être examinées en DLS. Cependant, leur procédé de fabrication étant identique à celles de $1\ \mu\text{m}$, il est raisonnable de supposer que leur polydispersité est équivalente.

Il existe une variabilité d’une bille à l’autre de la quantité d’oxyde de fer encapsulée, ce qui modifie leurs propriétés magnétiques, dont la susceptibilité χ [Shevkoplyas et al., 2007; van Ommering et al., 2009]. La distance centre à centre varie donc d’un couple de billes à l’autre car la force magnétique

pour un même champ appliqué diffère légèrement. L'écart-type sur χ pour une population de 10 billes analysées individuellement par van Ommering et al. [2009] est de 14%, ce qui donne $\frac{\delta d_{\text{mag}}}{d} \sim 7\%$ d'après la relation (4.1). Cette erreur semble très grande. Elle est probablement largement surestimée étant donné la petitesse de l'échantillon statistique.

La résolution sur le champ magnétique B créé est 0.1 mT. L'erreur commise est donc grande à faible champ. Cette source d'erreur est relativement masquée dans les résultats d'expérience puisque B n'apparaît jamais directement. A titre d'exemple, un champ de 1.5 mT permet de créer une force de l'ordre du pN avec les billes de 3 μm . Avec 80 mT, on atteint 200 pN. Ces forces dépendent de l'épaisseur de la couronne d'actine à la surface. La relation (4.1) permet de traduire l'erreur sur B en termes de distance. Pour une valeur typique de 5 mT (environ 10 pN), on trouve $\frac{\delta d_{\text{champ}}}{d} \sim 1\%$. Cette source d'erreur est peut-être à l'origine de l'hystérésis observée dans les mesures mécaniques entre la rampe de force croissante et la rampe décroissante (voir par exemple les FIGURES 4.3 et 5.11).

Les erreurs énumérées ci-dessus sont calculées pour un seul couple de billes. Le fait de réaliser une mesure moyenne sur N billes dans une chaîne diminue l'erreur totale commise de \sqrt{N} . Lors des mesures de suivi cinétique, l'erreur sur la mesure de distance est encore diminuée puisqu'on effectue un fit linéaire pour en déduire une vitesse.

D'un point de vue plus pragmatique, on peut estimer l'erreur expérimentale en réalisant plusieurs fois de suite la même mesure de vitesse à force constante. En se basant sur la FIGURE 5.15, l'écart-type sur la vitesse est estimé à 0.05 nm s^{-1} , soit 25% à faible force. Cette variabilité est bien plus grande que tous les bruits de mesure énumérés plus haut. Il semble donc que la principale source d'erreur soit de nature biochimique. Ainsi, on sait que d'un lot à l'autre de billes greffées, il existe une variabilité importante du nombre de gelsolines à la surface des billes. La variabilité d'une bille à l'autre au sein d'un même lot est sans doute importante elle aussi, comme on l'observe en mesurant la fluorescence de l'actine marquée Alexa488 (cf. paragraphe 4.6.3). Cette source d'erreur peut être amplifiée par le fait que les filaments poussent directement contre une paroi rigide car l'interaction avec la paroi peut varier beaucoup avec le nombre de filaments.

Enfin, ajoutons que dans la situation où toutes les billes sont recouvertes de filaments d'actine, l'écart-type sur la mesure de vitesse est plus faible : de l'ordre de 0.02 nm s^{-1} (FIGURE 5.4). Dans cette géométrie la distance entre les billes est moyennée sur 10 à 15 couples de billes alors qu'en utilisant des billes nues, la moyenne est réalisée sur seulement 4 ou 5 couples (c'est à dire de chaque côté des billes nues dans la chaîne). Le rapport environ 4 entre le nombre de billes est cohérent avec le rapport environ $\sqrt{4}$ entre les écarts-type.

4.6 Caractérisation des billes

La maîtrise de la géométrie dans laquelle polymérisent les filaments d'actine commence par la maîtrise des caractéristiques des billes magnétiques sur lesquelles ils poussent. On détaille dans cette section les méthodes de mesures permettant de connaître avec précision le diamètre des billes utilisées et le nombre de filaments polymérisant à leur surface.

4.6.1 Taille

Pour mesurer avec précision la distance entre les billes, il est important de connaître leur diamètre. En effet, on ne mesure pas directement la distance surface à surface des billes mais leur distance centre à centre.

Le diamètre exact des billes de 1 μm , mesuré en DLS (*Dynamic Light Scattering*), est 1150 nm. La polydispersité, donnée par la largeur à mi-hauteur de la distribution de taille, est de 2%.

Les billes de 3 μm sont trop grosses pour être analysée en DLS, car elles sédimentent trop rapidement dans l'échantillon. Une estimation de leur taille est réalisée en utilisant la machine de force par vidéomicroscopie (FIGURE 4.3).

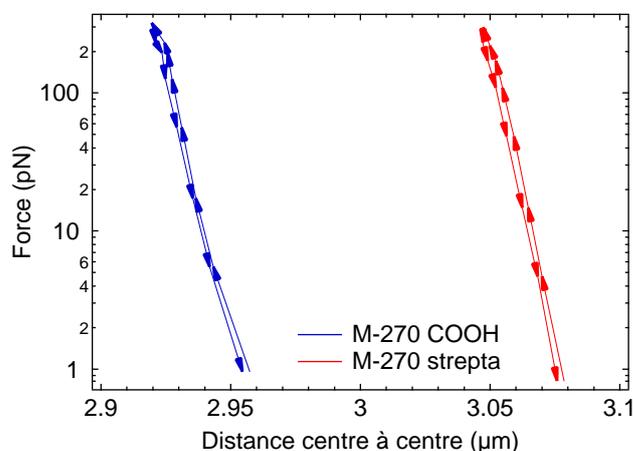


FIGURE 4.3 – Profil force-distance des billes de 3 μm en tampon F. Le sens des flèches correspond au cycle de force appliqué : une rampe croissante suivie d'une rampe décroissante. L'écart de distance entre les 2 branches est dans l'intervalle d'erreur de mesure (10 nm).

Pour cette expérience, les billes sont suspendues dans du tampon F (en l'absence d'actine). La force ionique de ce tampon est suffisamment grande pour pouvoir négliger l'espace entre les particules à force magnétique élevée et considérer qu'elles sont au contact. Les deux lots de billes utilisés au cours de ce travail de thèse ont été analysés ainsi. Pour les M-270 COOH, on trouve un diamètre moyen de 2920 nm. Pour les M-270 streptavidine, on trouve un diamètre moyen de 3040 nm.

4.6.2 Propriétés de surface

Les propriétés de surface renseignées par le fournisseur sont données dans la TABLE 4.5.

	Billes 1 μm	Billes 3 μm
Surface	Hydrophile (acides carboxyliques)	
Nombre de streptavidines	10^6 par bille	10^7 par bille
	(soit densité : $3 \cdot 10^5$ par μm^2)	

TABLE 4.5 – Propriétés de surface des billes magnétiques utilisées. *Données fournies par Dynal.*

4.6.3 Densité de gelsoline greffée

Selon le diamètre des billes considérées, plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser le nombre de filaments à leur surface. Ce nombre correspond à la quantité de gelsolines fonctionnelles.

4.6.3.1 Spectroscopie de fluorescence

La densité de gelsolines greffées à la surface des billes de 1 μm est mesurée par spectroscopie de fluorescence avec de l'actine marquée pyrène [Brangbour, 2008]. Cette technique repose sur la propriété du pyrène d'être environ 20 fois plus fluorescent lorsque les monomères marqués sont assemblés en filaments (actine-F) que lorsqu'ils sont libres en solution (actine-G) [Kouyama and Mihashi, 1981]. Ainsi, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'actine-F dans l'échantillon.

La nucléation spontanée de filaments est négligeable dans les conditions biochimiques où l'on se place. A temps court la quantité d'actine-F dans un échantillon est donc directement proportionnelle au nombre de gelsolines actives sur les billes, la constante de proportionnalité étant $k_{\text{on}}C_0 - k_{\text{off}}$ (où C_0 est la concentration initiale en actine-G).

Environ 1% des gelsolines mises en contact des billes pendant l'étape de greffage donnent naissance à un filament. Ce rendement est assez variable d'une expérience à l'autre.

La technique de spectroscopie présente l'avantage de pouvoir être étalonnée directement avec de la gelsoline en solution. Elle est bien adaptée à la caractérisation des billes de 1 μm mais ne convient pas à celles de 3 μm qui sédimentent trop rapidement au fond de la cuve. Nous avons donc cherché à développer une technique pour mesurer le signal lumineux émis par l'actine fluorescente à la surface des billes par une autre méthode.

4.6.3.2 Cytométrie en flux

Pour comparer le rendement de greffage de la gelsoline à la surface des billes de 1 μm et 3 μm , on utilise un cytomètre en flux (CyFlow ML, Partec). Dans cet appareil, les billes sont injectées à grande vitesse dans un canal fluide et passent une par une devant un détecteur qui mesure leur fluorescence de façon individuelle. Ce signal est directement proportionnel à la quantité d'actine à leur surface donc au nombre de filaments.

Pour cette expérience, on effectue la réaction de greffage dans des conditions telles que le nombre de gelsolines par unité de surface soit équivalent pour les deux types de billes. Autrement dit, pour une même quantité de gelsoline, on introduit un nombre 3^2 plus grand de billes de 3 μm .

Les expériences sont réalisées dans les conditions décrites au paragraphe 4.3.2 avec 2 μM d'actine marquée Alexa488. A $t + 10$ min après le début de la polymérisation, on prélève une partie de la solution de billes qu'on dilue 100 fois dans 2 μM de phalloïdine en tampon G. L'opération est répétée à $t + 20$, 30 et 40 min.

Les billes de 1 μm sont également caractérisées en spectroscopie de fluorescence, qui permet de dénombrer 10000 filaments à leur surface, soit un rendement de greffage de la gelsoline de 1%. En cytométrie, les billes de 3 μm présentent un signal fluorescent moyen environ 10 fois plus grand que celles de 1 μm . Elles possèdent donc 10 fois plus de filaments à leur surface, soit 100000.

Le rapport des nombres de filaments entre les deux types de billes est sensiblement égal au rapport des surfaces. On peut donc en conclure que la réaction de greffage a le même rendement pour les deux types de billes.

La cytométrie présente l'avantage de pouvoir analyser les deux types de billes. Mais elle requiert une quantité importante de produits et des manipulations relativement lourdes.

4.6.3.3 Microscopie confocale

Une fois le nombre de filaments à la surface des billes de 3 μm calibré grâce à la cytométrie, on peut facilement comparer deux lots différents de billes greffées en mesurant la quantité d'actine marquée Alexa488 à leur surface en microscopie confocale.

Pour démontrer la pertinence de cette technique, on commence par suivre l'évolution de l'intensité de fluorescence autour des billes à champ magnétique nul sur des images prises régulièrement au cours du temps pendant la polymérisation des filaments.

Pour cette expérience, 0.05% de billes de 3 μm sont mélangées avec 2 μM d'actine marquée Alexa488 en tampon F puis injectées dans un capillaire en verre scellé à ses extrémités par de la cire sur une lame de verre. L'observation se fait avec le microscope inversé Nikon TE-2000 muni du module

confocal Eclipse C1-Si et d'un objectif $\times 100$ d'ouverture numérique 1.25. Le diamètre du collimateur sténopéique ou *pinhole* utilisé est de $60 \mu\text{m}$. Environ 50 billes sont présentes dans le champ de l'image à cette concentration.

Que l'actine soit sous forme G ou F, l'intensité de fluorescence d'Alexa488 est identique. D'où l'intérêt de l'utilisation du confocal : les rayons lumineux ne provenant pas du plan focal ne sont pas focalisés dans le collimateur et sont donc arrêtés, alors qu'en microscopie de fluorescence classique ils parasitent l'image. Le bruit de fond émis par l'actine-G fluorescente en solution autour des billes est donc considérablement réduit. Ainsi, l'intensité de fluorescence autour des billes peut être considérée comme proportionnelle à la quantité d'actine-F à leur surface.

Pour réaliser une mesure précise de la fluorescence, les images doivent être prises dans le plan équatorial des billes. Une difficulté apparaît alors. Au début de l'expérience les billes magnétiques sont au contact du fond du capillaire, mais la force générée par la croissance des filaments soulève les billes qui remontent au cours du temps dans le capillaire. Pour cette raison, à chaque point de mesure un balayage vertical de l'échantillon est effectué et une image est enregistrée tous les 300 nm .

Les images obtenues sont traitées sous NIS-Elements. Après soustraction du bruit de fond et seuillage, l'intensité lumineuse totale de la couronne fluorescente d'actine et son diamètre extérieur sont mesurés. Pour chaque point de mesure, seule l'image correspondant à l'intensité maximale par bille est retenue. Il s'agit du plan équatorial des billes.

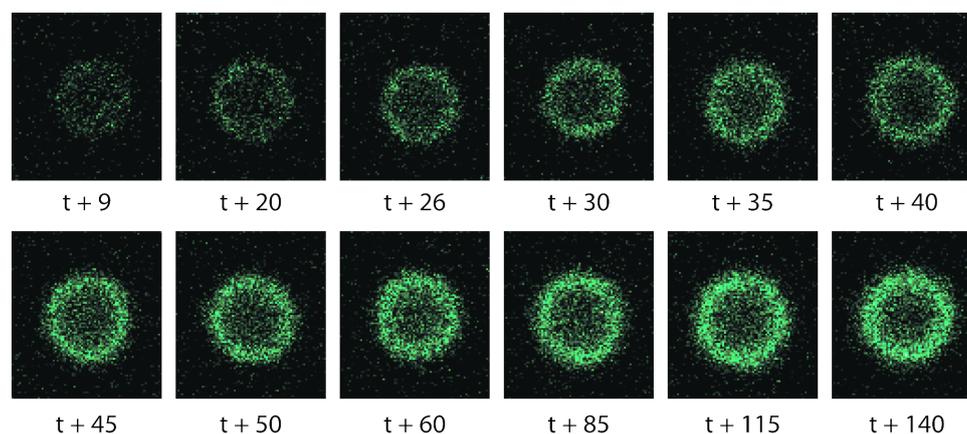


FIGURE 4.4 – Croissance de filaments d'actine marquée Alexa488 à la surface d'une bille de $3 \mu\text{m}$ observée en microscopie confocale. Les temps indiqués sont en nombre de minutes après le début de la polymérisation.

L'évolution de la fluorescence autour d'une bille de $3 \mu\text{m}$ est présentée FIGURE 4.4. On voit clairement que le diamètre de la couronne fluorescente et son intensité lumineuse augmentent au cours du temps puis saturent, une fois que la concentration critique en actine monomérique a été atteinte. L'évolu-

tion de ces deux paramètres, moyennés sur les 50 billes présentes dans l'image, est présentée FIGURE 4.5.

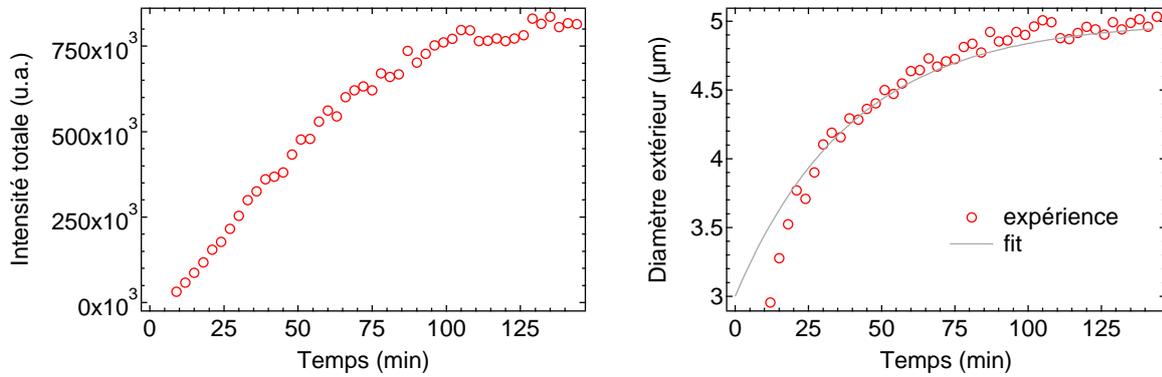


FIGURE 4.5 – Suivi temporel de l'intensité de fluorescence et du diamètre extérieur de la couronne d'actine autour de billes de 3 µm. Le temps $t = 0$ correspond au début de la polymérisation. La courbe d'évolution du diamètre est ajustée par l'expression de 2 fois la longueur d'un filament en solution $2L(t)$.

La valeur du diamètre sature à une valeur de 5 µm, ce qui correspond à une longueur des filaments $L_{\max} = 1$ µm. Or, connaissant le nombre de gelsolines fonctionnelles par bille (50000) et la quantité de billes, on peut calculer la longueur moyenne des filaments une fois la concentration critique atteinte. On trouve une valeur de 1.5 µm. On sous-estime donc en microscopie confocale la longueur des filaments. Cela peut s'expliquer par le fait que loin de la surface de la bille, les filaments sont très éloignés les uns des autres. La densité de fluorophores passe ainsi en-dessous du seuil de sensibilité de l'appareil.

Le diamètre $D(t)$ de la couronne fluorescente varie comme deux fois la longueur d'un filament. On vérifie dans l'Annexe C que l'influence de la diffusion dans le système est négligeable et que la longueur des filaments est bien régie par la vitesse de réaction. Après intégration de la loi de vitesse donnée par l'expression (3.10), on trouve :

$$D(t) = 2L(t) = 2R_{bille} + 2L_{\max} \left(1 - e^{-\frac{2\delta}{L_{\max}}(k_{\text{on}}C - k_{\text{off}})t} \right) \quad (4.3)$$

L'ajustement de la courbe d'évolution de $D(t)$ par cette expression est très bon, sauf à temps court. Là encore, on peut supposer que lorsque les filaments sont petits, la densité locale de fluorophores est trop faible pour les résoudre correctement.

La bonne adéquation du modèle et des points expérimentaux valide l'utilisation du microscope confocal pour mesurer la densité de filaments à la surface des billes. En routine, on se contente d'une seule mesure, une fois que la réaction de polymérisation est terminée. La valeur de l'intensité totale de fluorescence de la couronne permet de comparer le rendement de greffage de la gelsoline entre plusieurs lots de billes de 3 µm si tous les paramètres de capture d'image sont identiques. L'avantage de cette

technique est sa facilité de mise en oeuvre. Elle n'est cependant pas adaptée aux billes de 1 μm . Leur plus petite taille fait qu'elles bougent beaucoup, ce qui rend les images floues et la mesure imprécise.

4.7 Conclusion

Dans ce chapitre, on a présenté un dispositif expérimental permettant d'appliquer une charge à des filaments d'actine en croissance. La discussion de l'influence des différentes sources d'erreur et de bruit dans ce dispositif nous a permis de conclure qu'il est bien adapté pour mesurer avec précision la force appliquée par les filaments contre cette charge et la vitesse à laquelle ils la repoussent. On s'est appliqué à montrer comment les paramètres biochimiques de la polymérisation de l'actine dans ce système sont maîtrisés. On a décrit les méthodes permettant de caractériser la population de filaments d'actine à la surface des billes, ce qui permet d'en connaître l'organisation. Finalement, on a ainsi démontré que ce dispositif expérimental est très bien adapté pour sonder la génération de force par la polymérisation de filaments d'actine.

Mécanismes de génération de force par les filaments d'actine

5.1 Introduction

L'analyse de la littérature au chapitre 3 a mis en évidence que la majorité des phénomènes biochimiques à l'origine de la motilité cellulaire sont maintenant bien compris à l'échelle microscopique. Un grand nombre des acteurs moléculaires impliqués, ainsi que les interactions entre eux, sont connus avec précision. On maîtrise les modifications de la structure du cytosquelette d'actine qu'ils engendrent. Des modèles phénoménologiques, considérant le réseau d'actine comme un milieu continu, sont capables de décrire les forces mises en jeu dans la motilité cellulaire. Mais le mécanisme physique au coeur de la génération de force reste à élucider. Seuls des modèles purement théoriques ont été proposés.

Nous disposons dorénavant d'un système expérimental permettant d'appliquer des forces à une population de filaments d'actine dont la géométrie et l'organisation sont parfaitement maîtrisés.

On se propose donc d'examiner la validité des modèles théoriques de génération de force à la lumière des résultats expérimentaux obtenus. Pour cela, on examinera la croissance de filaments d'actine dans deux géométries différentes. La première correspond aux expériences de Coraline Brangbour [Brangbour, 2008]. Dans ce cas les filaments fluctuent beaucoup. Ces fluctuations sont cependant maîtrisées : les filaments sont assez courts pour être considérés comme des bâtonnets rigides et leur seul degré de liberté consiste à s'orienter librement autour de leur point d'ancrage. Nous montrerons par une ex-

périence complémentaire que cette situation est bien décrite par le modèle entropique. Dans la seconde géométrie, correspondant à nos expériences, les filaments sont toujours rigides mais leurs fluctuations sont supprimées en les rassemblant en des faisceaux. Ils poussent perpendiculairement à une barrière dure constituée par la surface des billes magnétiques. Avec ce système très rigide, on se situe dans un cas limite opposé où le modèle du *Brownian ratchet* devrait s'appliquer.

Toutes les expériences sont réalisées dans les conditions biochimiques décrites dans la TABLE 4.2.

5.2 Génération de force par des filaments très fluctuants

On a élaboré au laboratoire un modèle de génération de force par la croissance de filaments d'actine dans le cas de filaments courts assimilables à des bâtonnets et totalement libres de fluctuer par rotation autour de leur point d'ancrage. Ce modèle a été baptisé modèle entropique. Il a été inspiré par les expériences de polymérisation de filaments d'actine à la surface des billes sous champ magnétique. Les filaments exercent une force contre la bille qui leur fait face. En réaction, cette bille leur oppose une charge constante que l'on contrôle grâce à la valeur du champ magnétique.

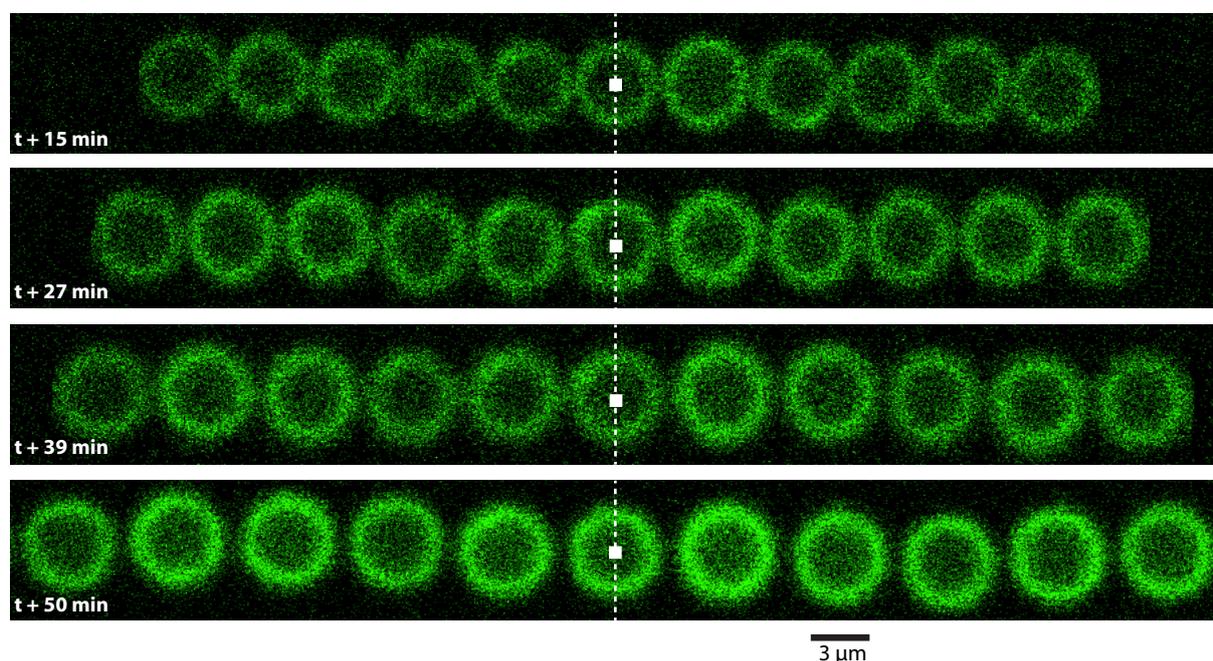


FIGURE 5.1 – Croissance d'actine observée au microscope confocal en l'absence de fascine sur les billes de $3 \mu\text{m}$ soumises à une force $F \sim 3 \text{ pN}$. Le centre de la chaîne est repéré sur les photos. Le temps t correspond au début de la polymérisation.

Sous l'effet de la polymérisation des filaments d'actine, les billes s'écartent au cours du temps. La FIGURE 5.1 illustre ce phénomène en montrant l'évolution au cours du temps d'une chaîne de billes

magnétiques recouvertes d'actine fluorescente Alexa488.

Jusqu'à présent, seuls des éléments indirects indiquent que la force générée par les filaments d'actine dans ces conditions est d'origine entropique. Dans cette section on se propose, après avoir présenté les résultats expérimentaux ayant mené à l'élaboration du modèle entropique, de montrer de façon directe la validité de ce modèle.

5.2.1 Détails du modèle entropique

La force d'origine entropique générée contre une paroi par N filaments indépendants libres de s'orienter autour de leur point d'ancrage est $F = N \frac{k_B T}{X}$ (cf. paragraphe 3.8.3). Ce calcul est valable en géométrie plane. Pour tenir compte de la sphéricité des billes, on introduit un coefficient géométrique c tel que :

$$F = c N \frac{k_B T}{X} \quad (5.1)$$

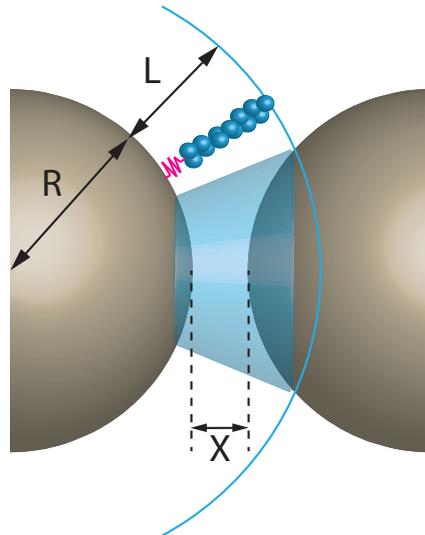


FIGURE 5.2 – Définition de la zone de contact.

Une autre conséquence de la géométrie sphérique est que le nombre N de filaments qui ressentent l'influence de la paroi, donc qui sont impliqués dans la génération de force, dépend de leur longueur L . On définit la zone de contact comme l'angle solide dans lequel se trouvent ces filaments. Un raisonnement géométrique [Brangbour, 2008] permet de calculer N à partir du nombre de gelsolines N_{gs} à la surface d'une bille. Avec les notations de la FIGURE 5.2, on trouve :

$$N = \frac{N_{gs}}{2} \left(1 - \frac{(2R + X)^2 + L(L + 2R)}{2(2R + X)(R + L)} \right) \quad (5.2)$$

L'expression (5.1) permet d'ajuster les courbes de réponse mécanique de filaments de longueur différentes (FIGURE 5.3). Ces courbes sont obtenues en appliquant une rampe de force croissante puis décroissante à des filaments ayant polymérisé sous champ magnétique nul à la surface des billes pendant un temps donné.

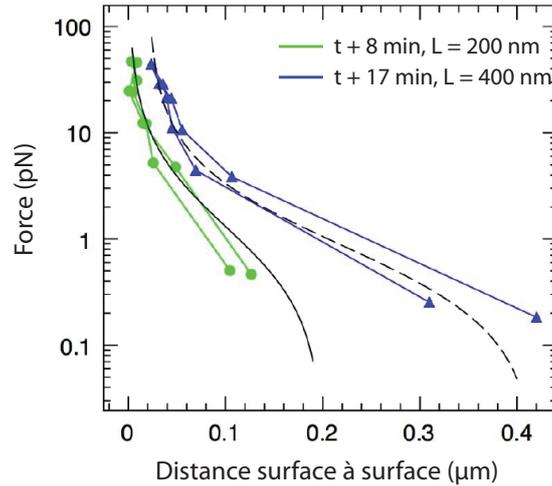


FIGURE 5.3 – Courbes force - distance mesurées avec des billes de 1 µm toutes recouvertes d'actine pour 2 longueurs différentes des filaments. L'ajustement par le modèle entropique (lignes noires pleine et brisée) est réalisé avec $c = 0.2 \pm 0.1$. Par souci de clarté, les courbes correspondant à $L = 400$ nm sont décalées de 5 nm à droite. Adapté de [Brangbour et al., 2011].

Dans le cadre du modèle entropique, la longueur des filaments d'actine est indépendante de la force appliquée. En effet, grâce aux fluctuations autour de leur point d'ancrage, ils ne sont en moyenne pas au contact de la paroi qui leur impose cette force. Quelle que soit la force, la longueur des filaments à un temps t peut donc toujours être calculée par l'expression $L(t) = v_0 t$ où v_0 est la vitesse de polymérisation en solution.

La distance surface à surface X entre les billes peut être déduite des expressions (4.1) et (5.2) après un développement de N au premier ordre en X/R et L/R :

$$X(t) = \frac{k_B T c N_{gs}}{4FR + k_B T c N_{gs}} v_0 t \quad (5.3)$$

On en déduit alors la vitesse d'écartement des billes à force maintenue constante :

$$v_{\text{billes}} = \frac{dX}{dt} = \frac{k_B T c N_{gs}}{4FR + k_B T c N_{gs}} v_0 \quad (5.4)$$

Ainsi, selon ce modèle, c'est uniquement parce que le nombre de filaments dans la zone de contact augmente au cours du temps qu'on voit les billes s'écarter les unes des autres. La vitesse d'écartement

devrait être constante, ce qui est bien vérifié expérimentalement (FIGURE 5.4 - *gauche*). Le modèle permet également d'ajuster le profil vitesse - force (FIGURE 5.4 - *droite*). Ses deux caractéristiques principales sont bien vérifiées expérimentalement : à force faible la vitesse tend vers v_0 et à force forte la vitesse tend vers 0 sans jamais être négative.

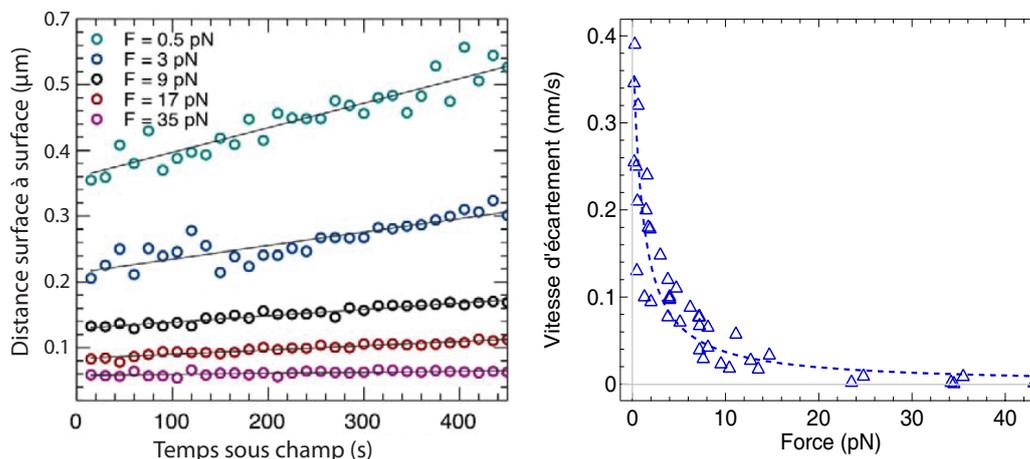


FIGURE 5.4 – *Gauche* : Écartement au cours du temps de billes $1 \mu\text{m}$ toutes recouvertes de filaments d'actine à différentes forces. *Droite* : Profil vitesse - force correspondant, pour $N_g s = 4000$. La ligne brisée correspond au modèle entropique, avec $c = 0.1$. Adapté de [Brangbour et al., 2011].

En conclusion, le modèle entropique explique très bien les données expérimentales. Mais aucune expérience ne le met en évidence directement. On pourrait très bien envisager d'ajuster les données par d'autres modèles. Ainsi, le *Brownian ratchet* décrit convenablement le profil vitesse - force du système.

5.2.2 Validation du modèle

Pour obtenir une preuve directe que la force engendrée par les filaments dans cette géométrie fluctuante est d'origine entropique, on se propose de mettre en évidence sa propriété essentielle, qui discriminerait définitivement le *Brownian ratchet* : la longueur des filaments ne dépend pas de la force appliquée. En d'autres termes, il s'agit de montrer que la longueur des filaments à un temps donné d'une expérience ne dépend pas de l'histoire de la force qui leur a été appliquée. On observe pour cela la réaction du système à une séquence de forces différentes appliquées successivement.

On réalise pour commencer un suivi cinétique de la polymérisation sous une force constante faible de 0.8 pN (FIGURE 5.5). La vitesse d'écartement des billes est constante, égale à 0.30 nm s^{-1} . Si l'on maintenait la force à 0.8 pN , on sait que $X(t)$ continuerait à augmenter à la même vitesse, suivant l'extrapolation tracée FIGURE 5.5, pendant encore au moins 500 s .

Au lieu de maintenir la force constante, à $t = 650 \text{ s}$ elle est brutalement augmentée à 39 pN , ce qui

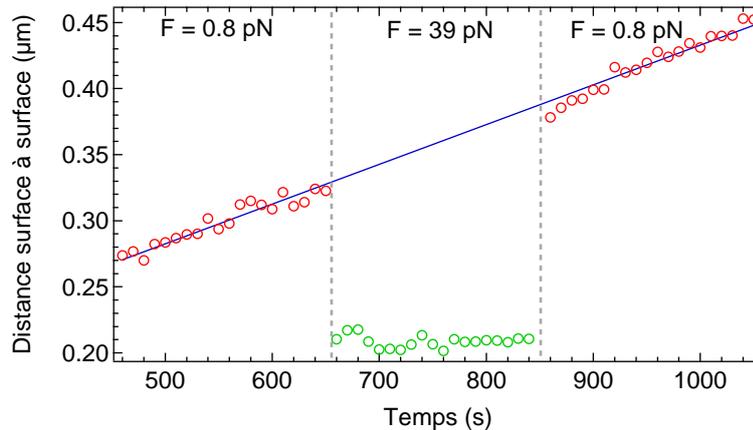


FIGURE 5.5 – Suivi de la distance entre des billes de 1 μm toutes recouvertes d'actine pendant une séquence de force faible-forte-faible. Le temps $t = 0$ correspond au début de la polymérisation.

a pour conséquence immédiate de diminuer $X(t)$ de 110 nm. Cette diminution est trop rapide pour être attribuée à la dépolymérisation de l'actine. Il s'agit donc plutôt d'une compression des filaments qui se réarrangent par rotation autour de leur point d'ancrage sous l'effet de la charge appliquée.

La force est ensuite maintenue à 39 pN pendant 200 s. Pendant toute cette période, $X(t)$ reste constante. Puis à $t = 850$ s, la force est rapidement ramenée à la valeur initiale de 0.8 pN. Immédiatement, $X(t)$ augmente de 175 nm. Cet effet, trop rapide pour être lié à la polymérisation de l'actine, est attribué au réarrangement des filaments pour s'accommoder à la charge plus faible. Après cette décompression, $X(t)$ ne revient pas à la même valeur qu'à la fin de la première période sous faible force mais à une valeur supérieure. On a $\Delta X = X(t = 850) - X(t = 650) = 65$ nm. Plus précisément, $X(t)$ revient à la même valeur que si la force n'avait pas été changée en cours d'expérience. Ce ΔX observé ne peut s'expliquer que parce que les filaments ont grandi pendant la période de force forte, alors que la vitesse d'écartement des billes était nulle.

Enfin, pendant le reste de l'expérience, la force est maintenue constante à 0.8 pN pendant le reste de l'expérience et les billes recommencent à s'écarter à une vitesse constante de 0.30 nm s^{-1} identique à la première période de faible force. La courbe $X(t)$ suit l'extrapolation de la courbe observée pendant la première période de faible force.

On peut reformuler le résultat de cette expérience de la façon suivante. Considérons plusieurs échantillons de filaments en croissance sur des billes magnétiques auxquels on fait subir une séquence de force différente. Si au même temps t de l'expérience on leur applique la même force, alors $X(t)$ sera identique pour tous les échantillons. On a ainsi montré que $X(t)$, et donc la longueur des filaments, ne dépendent pas de l'histoire du système. En fonction de la force appliquée, les filaments se réarrangent

différemment mais croissent toujours à la même vitesse. Pour des raisons de continuité lorsque la force appliquée tend vers 0, cette vitesse ne peut être égale qu'à la vitesse de polymérisation en solution. La longueur des filaments est donc bien indépendante de la force appliquée. Elle est toujours identique à celle de filaments poussant en solution.

Ce résultat est clairement en contradiction avec le *Brownian ratchet*. Dans le cadre de ce modèle, la vitesse de polymérisation des filaments dépend de la force, donc la longueur des filaments dépend de l'histoire. Pendant la période de force forte, les filaments ne s'allongeraient que très peu voire pas du tout. On aurait donc $\Delta X \sim 0$.

5.2.3 Conclusion

Dans une géométrie où les filaments sont très fluctuants, on a mis en évidence de manière directe la validité du modèle entropique dans une géométrie où les filaments fluctuent beaucoup. Ce résultat démontre de façon frappante le rôle de l'entropie dans la génération de force : si on laisse aux filaments la liberté de s'orienter face à la paroi qui leur applique une charge, le confinement lié à la proximité de cette paroi génère une force suffisante pour repousser la charge. Dans cette géométrie, les filaments ne sont en moyenne pas au contact de la paroi et leur vitesse d'élongation est la même qu'en solution. La génération de force n'est donc qu'une conséquence indirecte de la polymérisation.

Ce mécanisme est-il pertinent pour le phénomène de motilité cellulaire ? Dans le lamellipode, c'est généralement l'extrémité barbée qui est orientée vers la barrière que représente la membrane. A proximité de cette membrane, de nouveaux filaments sont créés soit par nucléation et élongation processive par les formines, soit par branchement via le complexe WASP - Arp2/3. Bien que la jonction entre un nouveau filament initié par Arp2/3 et le filament-mère ait une certaine flexibilité d'orientation [Blanchoin et al., 2000], elle n'est probablement pas aussi souple que le lien streptavidine-gelsoline qui sert de point d'ancrage aux filaments dans nos expériences. Il existe cependant certains cas où le modèle entropique pourrait être en jeu. Les filaments conservent une orientation moyenne constante avec le front du lamellipode, grâce en partie à l'interaction de leur bout barbé avec des protéines régulatrices membranaires comme VASP, qui maintiennent un lien processif avec l'extrémité en croissance. En l'absence d'un tel lien, les cellules migrent avec une persistance directionnelle plus faible. Ce phénotype pourrait être engendré par une plus grande liberté de réorientation des filaments. De même, Koestler et al. [2008] observent que la vitesse de protrusion dans le lamellipode semble être corrélée avec l'orientation moyenne des filaments, ce qui est similaire aux observations faites dans nos expériences. Ainsi, selon la densité de filaments, la vitesse de protrusion et le type de protéines régulatrices impliquées, différents

mécanismes de génération de force peuvent être mis en jeu en même temps dans la motilité cellulaire et la variation d'orientation des filaments a un rôle non négligeable.

En se plaçant dans une situation idéale où tous les filaments sont libres de s'orienter, on a pu isoler un mécanisme particulier et l'étudier de façon approfondie. Afin d'explorer l'ensemble des mécanismes impliqués, il apparaît donc primordial de pouvoir maîtriser l'organisation des filaments dans la zone de contact avec la barrière, ce qui permettrait de se placer dans d'autres situations idéales et isoler ainsi d'autres mécanismes de génération de force.

5.3 De la maîtrise de l'amplitude des fluctuations

Nous avons mis en évidence au chapitre 3 que le mécanisme de génération de force dépend de façon critique de l'organisation des filaments face à la paroi. L'idée dans cette partie est de jouer sur l'amplitude des fluctuations d'orientation pour mettre en jeu d'autres phénomènes que l'entropie dans la génération de force. Dans ce but, on ajoute de la fascine dans le milieu réactionnel. Cette protéine est capable de regrouper les filaments parallèlement les uns aux autres en des câbles appelés faisceaux ou *bundles*.

5.3.1 La fascine

La fascine a été isolée pour la première fois dans les années 1970 à partir d'oeufs d'oursin [Bryan and Kane, 1978]. Possédant deux sites de liaison à l'actine, elle a la capacité de réticuler les filaments d'actine sous forme de faisceaux parallèles, ce qui lui a valu son nom (*fasciculus* en latin signifie un paquet, un fagot [Kureishy et al., 2002]). De toutes les protéines réticulatrices de l'actine connues, la fascine est celle qui forme les structures les plus rigides. Sa petite taille (55 kDa) et sa structure tridimensionnelle compacte sont largement responsables de cette propriété [Matsudaira, 1994].

In vivo, chez les vertébrés, la fascine est présente dans la plupart des tissus, avec une abondance particulière dans les cellules possédant des structures à base d'actine très rigides comme les neurones ou les cellules musculaires. La fascine est impliquée dans le phénomène de motilité cellulaire : l'inhibition de son interaction avec l'actine perturbe fortement la migration de fibroblastes [Kureishy et al., 2002]. Son rôle est fortement lié à la formation des filopodes, dans lesquels les filaments d'actine sont rigidement liés parallèlement entre eux [Svitkina et al., 2003].

Les études *in vitro* révèlent que les structures actine - fascine sont fortement organisées. La décoration par des têtes de myosine montre que les faisceaux sont unipolaires : tous les filaments au sein d'un

faisceau sont orientés de la même façon, avec leurs extrémités barbée et pointue dans la même direction [Ishikawa et al., 2003; Jansen et al., 2011]. Les filaments se trouvent à une distance bien définie les uns des autres, qui vaut 8 nm d'après les images de microscopie électronique TEM [Bryan and Kane, 1978; Jansen et al., 2011]. De plus, la diffusion de rayons X aux petites angles (SAXS) montre que les filaments s'arrangent en une structure hexagonale [Claessens et al., 2008].

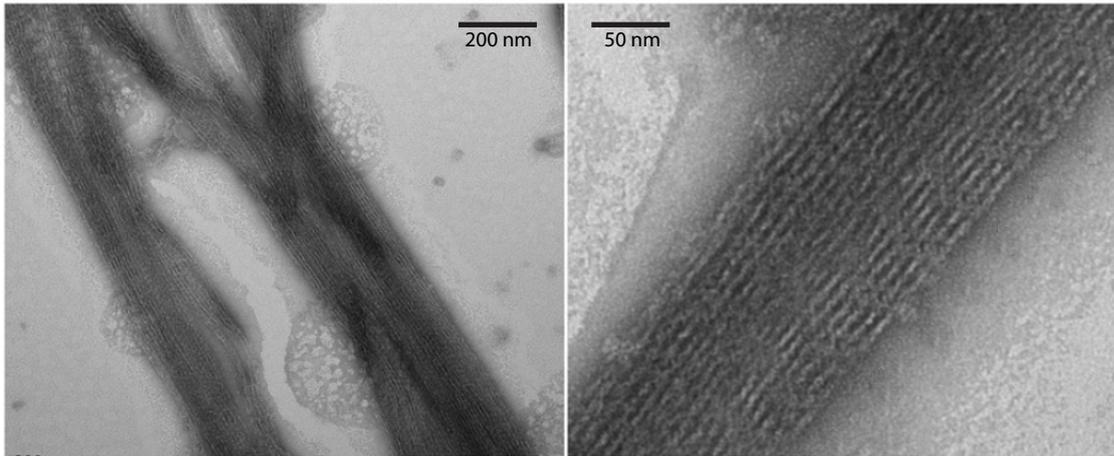


FIGURE 5.6 – Images TEM en coloration négative de faisceaux de filaments d'actine obtenus après incubation d'actine et de fascine à un ratio molaire 1:1. Extrait de [Jansen et al., 2011].

Le nombre de filaments par faisceau ne dépend que du rapport de la quantité de fascine à la quantité d'actine R et reste fini. Il sature à une valeur d'environ 20 lorsque $R > 0.25$ [Ishikawa et al., 2003; Haviv et al., 2008; Claessens et al., 2008], ce qui correspond à la stoechiométrie observée d'une fascine pour 4 à 5 monomères d'actine dans un faisceau [Bryan and Kane, 1978]. Il est intéressant de remarquer que la structure des faisceaux est indépendante du mode de préparation : que la fascine soit introduite alors que toute l'actine est encore sous forme monomérique ou après la polymérisation des filaments, les résultats obtenus sont similaires [Haviv et al., 2008; Claessens et al., 2008; Jansen et al., 2011].

La constante de dissociation entre la fascine et les filaments d'actine vaut $K_D = 0.15 \mu\text{M}$ [Ono et al., 1997]. Par des mesures de décroissance de fluorescence utilisant de la fascine marquée par un fluorophore, Aratyn et al. [2007] et Courson and Rock [2010] trouvent une constante cinétique de dissociation entre la fascine et les filaments d'actine $k_{\text{off}} = 0.12 \text{ s}^{-1}$. La relation $K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$ permet de déduire $k_{\text{on}} = 0.8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Au vu de ces considérations, pour obtenir les faisceaux d'actine les plus larges et donc les plus rigides possibles, on choisit donc se placer à un ratio $R = 1$ dans les expériences utilisant la fascine, soit une concentration de $2 \mu\text{M}$. Dans ces conditions, le taux d'addition de la fascine sur les filaments d'actine est environ 1.6 s^{-1} , ce qui est grand devant le taux de polymérisation des filaments (0.24 s^{-1}). On pourra

donc faire l'hypothèse que les faisceaux d'actine se forment instantanément à la surface des billes.

5.3.2 Modification de l'organisation des filaments par la fascine

5.3.2.1 Visualisation au microscope confocal

La FIGURE 5.7 présente deux clichés de microscopie confocale des billes réalisés dans les mêmes conditions biochimiques en l'absence et en présence de fascine. Pour bien visualiser la différence de géométrie, ces photos sont réalisées avec des filaments très longs, obtenus en laissant polymériser de l'actine à $6 \mu\text{M}$ jusqu'à atteindre l'équilibre. A cette concentration, si toute l'actine polymérisait sur les amorces gelsoline à la surface des billes, la longueur des filaments atteindrait $9 \mu\text{m}$. Cette valeur est surestimée car étant donné la forte concentration d'actine et la longue durée de l'expérience, la nucléation en solution n'est plus négligeable. On voit d'ailleurs nettement sur la photo de droite de la FIGURE 5.7 des faisceaux d'actine qui ne proviennent pas de la surface de la bille.

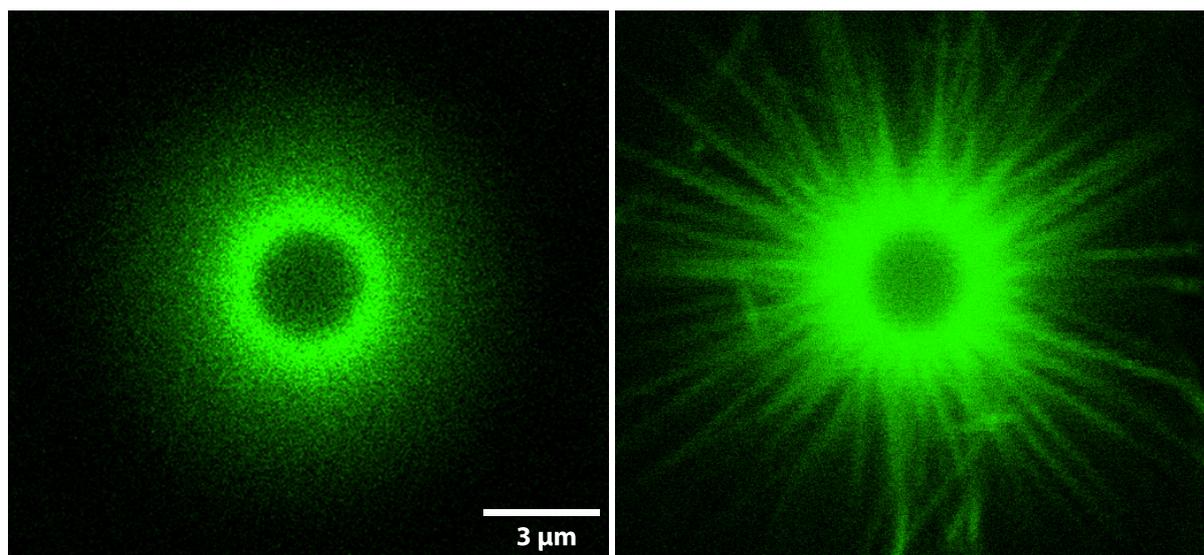


FIGURE 5.7 – Observation en microscopie confocale des filaments d'actine à la surface de billes de $3 \mu\text{m}$ en l'absence (*gauche*) et en présence (*droite*) de $2 \mu\text{M}$ de fascine. Les photos sont prises après 3 h de polymérisation de $6 \mu\text{M}$ d'actine marquée Alexa488, dans le plan équatorial des billes. L'échelle est identique pour les deux photos.

En l'absence de fascine, on observe un halo fluorescent diffus autour de la bille : les filaments fluctuent beaucoup trop pour être résolus par le microscope. La taille de ce halo est d'environ $4 \mu\text{m}$ à partir de la surface de la bille. Au-delà, la distance entre les filaments devient trop grande et la concentration locale de fluorophores est en-dessous du seuil de détection.

Les filaments, très fluctuants sans fascine, deviennent rigides et figés quand elle est introduite dans le système. L'image peut être moyennée sur un plus grand nombre d'acquisitions pour distinguer

de façon nette chaque faisceau sur une longue distance : environ $6 \mu\text{m}$ à partir de la surface de la bille.

La géométrie observée est très régulière. Les faisceaux poussent perpendiculairement à la surface de la bille. Leur longueur, leur largeur et leur intensité de fluorescence sont très homogènes sur l'ensemble de la population. On mesure une largeur de 200 nm , ce qui correspond à la limite de résolution du microscope confocal. On peut donc seulement conclure que le diamètre des faisceaux est au maximum de 200 nm . Par ailleurs, aucun branchement entre les faisceaux n'est observé.

On dénombre environ 30 faisceaux dans le premier plan de cette image. On estime que ces faisceaux sont répartis sur une profondeur d'environ $1 \mu\text{m}$. Une bande de $1 \mu\text{m}$ située autour du plan équatorial couvre 5% de la surface totale d'une bille. On en déduit un nombre approximatif de 600 faisceaux par bille. Si chaque faisceau contient 20 filaments [Ishikawa et al., 2003; Haviv et al., 2008; Claessens et al., 2008], on obtient 12000 filaments par bille.

Ce dénombrement, bien qu'approximatif, donne un résultat 4 fois plus petit que le nombre de gelsolines actives mesurées en fluorescence au paragraphe 4.6.3. Il est très peu probable que des filaments se trouvent sous forme isolée à la surface de la bille. Si c'était le cas, on ne pourrait pas voir les faisceaux de façon aussi nette. De plus, les expériences de TEM montrent qu'au ratio [fascine]/[actine] utilisé ici, aucun filament isolé n'est visible [Haviv et al., 2008; Claessens et al., 2008]. Enfin, on montre au paragraphe suivant que la formation de faisceaux est énergétiquement favorisée. Une hypothèse plus réaliste est que la formation des faisceaux empêche de pousser une partie des filaments. Il faut aussi tenir compte de l'incertitude relativement grande sur la méthode de comptage des gelsolines actives, dont la calibration est indirecte.

5.3.2.2 Aspect énergétique

L'observation en microscopie confocale suggère que les filaments s'assemblent spontanément en faisceaux à la surface des billes. Tâchons maintenant, par des arguments énergétiques, de caractériser géométriquement cet assemblage.

Ferrer et al. [2008] mesurent une énergie de dissociation W de deux filaments d'actine liés par la filamine ou l' α -actinine de $4 k_B T$ tous les 20 nm , ce qui fournit une limite basse pour la fascine. Il s'agit d'estimer le coût énergétique de courbure nécessaire pour rapprocher deux filaments et les assembler en faisceau et de le comparer à cette valeur. On s'inspire pour cela de l'approche décrite par Kuhne et al. [2009]. On considère deux filaments polymérisant sur une paroi (FIGURE 5.8). Leur point d'ancrage est distant de h . L'un est arbitrairement considéré comme non courbé, l'autre se courbe sur une longueur s avec un rayon de courbure R pour rejoindre le premier. Les filaments sont liés sur une longueur l_2 . La longueur totale des filaments est $L \sim l_1 + l_2$.

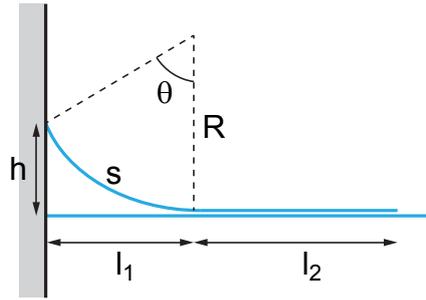


FIGURE 5.8 – Géométrie simplifiée d'un faisceau de filaments d'actine considérée pour le calcul d'énergie.

Dans cette géométrie, $h = R(1 - \cos \theta)$, soit $h^2 = R^2(1 - 2 \cos \theta + \cos^2 \theta)$.

Or $l_1 = R \sin \theta$, d'où $h^2 + l_1^2 = 2Rh$. On obtient donc comme expression de R :

$$R = \frac{h^2 + l_1^2}{2h} \sim \frac{l_1^2}{2h} \quad \text{si} \quad h \ll l_1 \quad (5.5)$$

De même, si $h \ll l_1$, $s = R\theta \sim l_1$. Ces considérations géométriques permettent de calculer l'énergie de courbure :

$$U_c = \int \frac{\lambda_p k_B T}{R^2} ds = \frac{\lambda_p k_B T s}{R^2} \sim \frac{4\lambda_p k_B T h^2}{l_1^3} \quad (5.6)$$

L'énergie d'assemblage en faisceau vaut $U_1 = -Wl_2 = -W(L - l_1)$. A l'équilibre, l'énergie totale $U_{\text{tot}} = U_1 + U_c$ vérifie :

$$\frac{\partial U_{\text{tot}}}{\partial l_1} = 0 \iff -12 \frac{\lambda_p k_B T h^2}{l_1^4} + W = 0 \quad (5.7)$$

traduisant le fait que le filament se courbe plus ou moins selon le rapport entre U_1 et U_c . On obtient comme valeur de l_1 :

$$l_1 = \left(\frac{12\lambda_p k_B T h^2}{W} \right)^{1/4} \quad (5.8)$$

Cette valeur est peu sensible à l'énergie de liaison donc à la quantité de fascine dans le système. La distance entre les points d'ancrage des filaments sur une bille de $3 \mu\text{m}$ avec 50000 gelsolines est $h \sim 25 \text{ nm}$. Avec $\lambda_p = 9 \mu\text{m}$, on obtient :

$$l_1 \sim 120 \text{ nm} \quad (5.9)$$

On vérifie bien $h \ll l_1$.

Les filaments deviennent plus longs que l_1 au bout de 5 min de polymérisation à champ magnétique nul. Dans toutes les expériences, le champ est allumé après 10 min de polymérisation et les mesures commencent après environ 12 min de polymérisation. Il est donc raisonnable de faire l'hypothèse qu'à tout moment des mesures, les filaments sont assemblés de façon stables en faisceaux.

Pour pouvoir créer un gros faisceau, il faut rassembler des filaments de plus en plus éloignés les uns des autres (FIGURE 5.9). On conçoit donc l'existence d'un nombre fini de filaments par faisceau au-delà duquel U_c devient trop grande. D'après les observations de microscopie confocale et la littérature, ce nombre est environ 20.

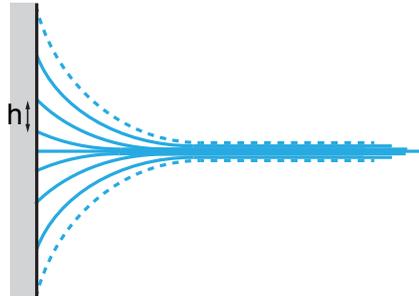


FIGURE 5.9 – Schéma d'un faisceau de filaments d'actine contenant un grand nombre de filaments.

Le schéma de la FIGURE 5.9 doit être interprété à 3 dimensions dans la réalité. On voit donc que la liberté de fluctuations d'orientation d'une telle structure est considérablement réduite par rapport à celle d'un filament isolé. Examinons donc maintenant les conséquences de la suppression de ces fluctuations sur le comportement du système.

5.3.3 Augmentation de la rigidité par la fascine

Pour vérifier que les faisceaux d'actine sont aussi rigides que leur organisation le suggère, on compare le résultat de mesures mécaniques à différents temps de polymérisation, donc différentes longueurs des filaments, en présence et en l'absence de fascine.

5.3.3.1 Cas sans fascine

On commence par vérifier que le comportement mécanique sans fascine est bien conforme au modèle entropique dans la nouvelle géométrie des expériences où les filaments poussent sur des billes plus grosses et contre une paroi dure.

Les courbes expérimentales sont bien ajustées par le modèle entropique (FIGURE 5.10). Notons que la distance surface à surface à force faible est toujours légèrement supérieure à la longueur des filaments, ce qui est probablement dû aux fluctuations, à la fois des filaments et des billes.

On remarque de plus un écart de 50 à 100 nm entre la rampe de force croissante et la rampe décroissante. Après avoir subi une forte force, le système ne relaxe pas tout à fait à sa position d'origine : les filaments sont légèrement plus comprimés à la fin de l'expérience qu'au début. Cette compression

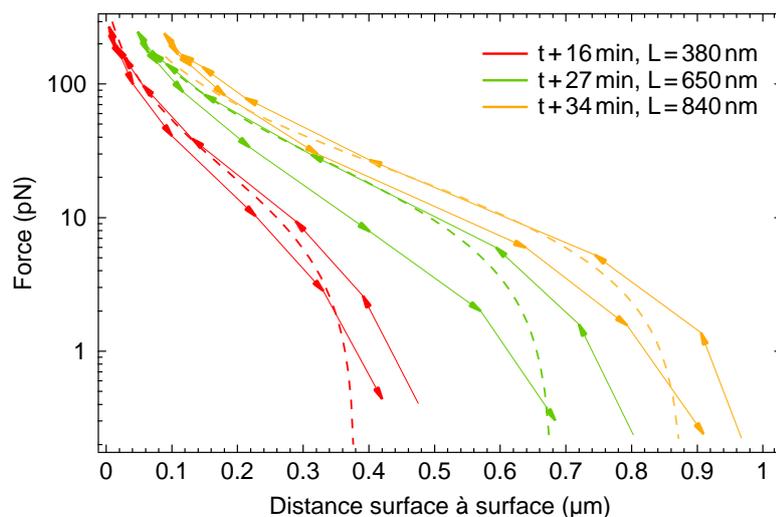


FIGURE 5.10 – Mesures mécaniques réalisées sans fascine avec des billes de $3\ \mu\text{m}$ pour différentes longueurs de filaments. Le temps t correspond au début de la polymérisation. L'ajustement par le modèle entropique (lignes brisées) est effectué avec les paramètres $c = 1.5$ et $N_{\text{gs}} = 50000$.

n'endommage pas les filaments de façon irréversible. En effet, après quelques secondes de repos, la distance surface à surface retrouve sa valeur d'origine. Si on réalise alors une seconde mesure mécanique, la courbe expérimentale obtenue sera en tous points superposable à la précédente.

5.3.3.2 Cas avec fascine

La comparaison des mesures mécaniques avec et sans fascine pour des filaments de la même longueur montre bien la rigidité des faisceaux (FIGURE 5.11). Sans fascine on observe que l'application d'une force d'environ $200\ \text{pN}$ permet de comprimer la couronne d'actine de $490\ \text{nm}$ à $t+20\ \text{min}$ et de $850\ \text{nm}$ à $t+35\ \text{min}$, c'est à dire la totalité de son épaisseur. Avec fascine, la compression de la couronne n'est plus que de $290\ \text{nm}$ à $t+20\ \text{min}$ et $320\ \text{nm}$ à $t+35\ \text{min}$, soit respectivement 40% et 30% de son épaisseur. Pour atteindre le même degré de compression sans fascine, il suffit d'appliquer une force d'environ $10\ \text{pN}$, soit 20 fois plus faible.

Dans le domaine de force exploré, aucun dommage n'est infligé aux filaments ni aux liens créés entre eux par la fascine. En effet, comme le montre la FIGURE 5.12, le décalage de distance observé entre la rampe de force décroissante et la rampe croissante est réversible et les courbes réalisées à quelques dizaines de secondes d'intervalle sont superposables.

A faible force, la distance surface à surface est égale à la longueur des filaments. En représentation log - linéaire, les courbes force - distance sont quasiment des portions de droite de pente identique. Leur forme est donc indépendante de la longueur des filaments, au contraire de ce qu'on observe lorsque la

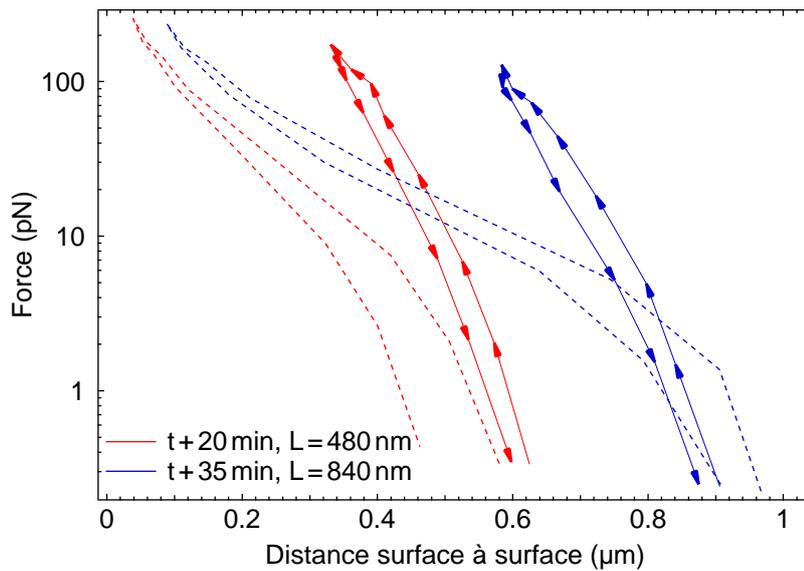


FIGURE 5.11 – Mesures mécaniques réalisées avec des billes de 3 µm et 2 µm de fascine pour différentes longueur de filaments. Le temps t correspond au début de la polymérisation. En pointillé sont portées les courbes obtenues sans fascine pour les mêmes longueurs de filaments.

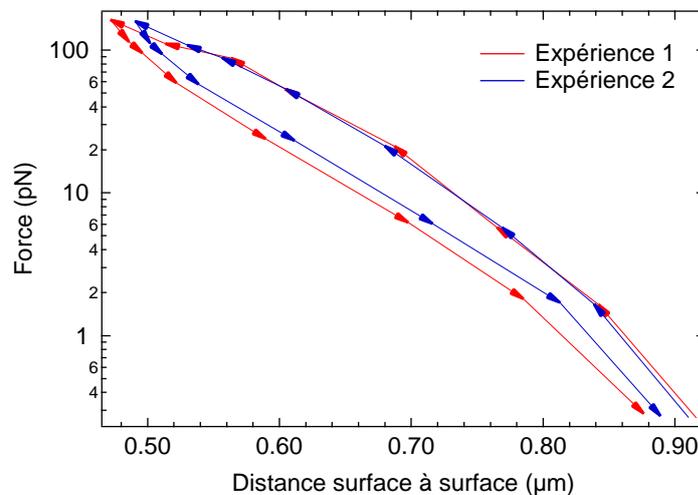


FIGURE 5.12 – Mesures mécaniques effectuées successivement sur la même chaîne de billes de 3 µm après 37 min de polymérisation d'actine, soit une longueur de filaments de 890 nm. La concentration de fascine vaut 1 µM.

force générée est d'origine entropique.

Il est donc probable que l'on sonde ici l'élasticité des faisceaux d'actine, qui varie peu dans le domaine de longueur de filaments exploré ici. Contrairement au cas entropique, la réponse élastique d'un faisceau est délicate à modéliser. Pour calculer le fléchissement d'une telle structure, il faut tenir compte du cisaillement généré sur les molécules de fascine entre les filaments [Claessens et al., 2006].

Nous venons de voir que la mécanique des filaments d'actine est très différente avec et sans fascine dans le système. Sans fascine, les filaments se réorientent autour de leur point d'ancrage pour s'accommoder de la force qui leur est appliquée. Avec la fascine, les filaments ne peuvent pas se réorienter. Ils s'opposent directement à la force et l'on sonde leur élasticité quand la charge augmente. Étant donné ces différences de comportement mécanique, on peut donc s'attendre à ce que l'effet sur la vitesse d'écartement des billes soit lui aussi bien différent.

5.3.4 Séquence de forces différentes

Que ce soit avec ou sans fascine, on observe toujours les billes s'écarter linéairement avec le temps quand la force est maintenue constante, et ce sur des durées supérieures à 5 minutes (FIGURE 5.13). On peut donc continuer de mesurer la pente des courbes de distance entre les billes en fonction du temps pour obtenir leur vitesse d'écartement. De plus, la vitesse diminue lorsque la force appliquée augmente.

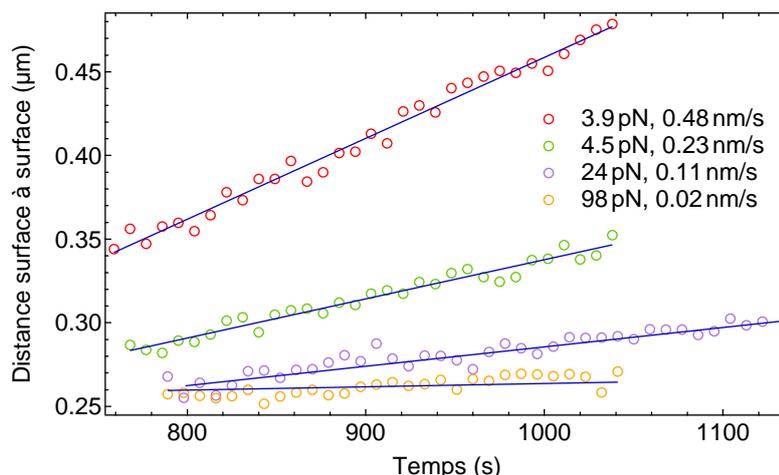


FIGURE 5.13 – Suivi de la distance entre les billes de $3\ \mu\text{m}$ à force maintenue constante pour des échantillons contenant $2\ \mu\text{M}$ de fascine. Le temps $t = 0$ correspond au début de la polymérisation.

Comme on l'a vu précédemment, l'application d'une séquence de force faible puis augmentée brusquement et enfin ramenée à la valeur initiale est riche d'enseignement sur le mécanisme à l'origine de la génération de force.

Lorsqu'on réalise cette expérience sans fascine, la forme de la courbe obtenue est, comme on s'y attend, conforme au modèle entropique (FIGURE 5.14 - *Haut*). Les points expérimentaux pendant les deux périodes de force faible tombent quasiment sur la même droite, à un faible écart près $\Delta X = 20\ \text{nm}$: les filaments sont légèrement plus comprimés après avoir subi une charge forte. La valeur de ΔX est cohérente avec le décalage observé lors des mesures mécaniques entre la rampe de force croissante et la

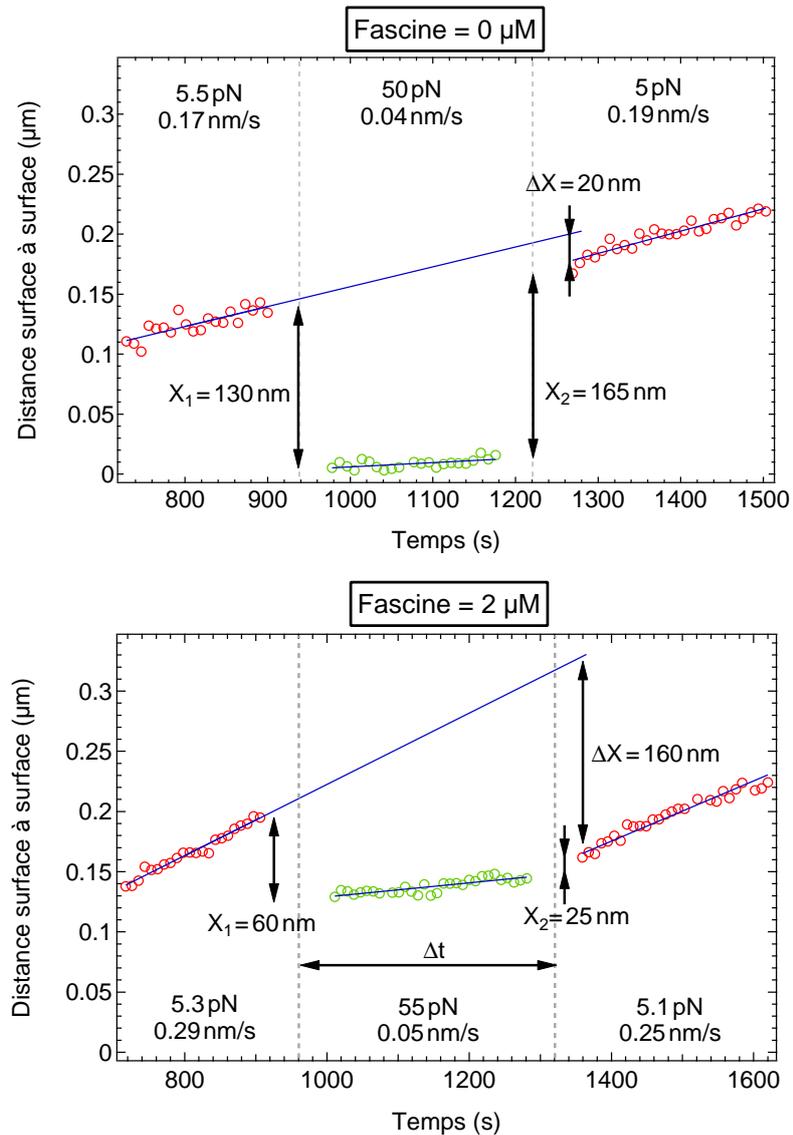


FIGURE 5.14 – Suivi de la distance entre les billes pendant une séquence de force faible-forte-faible avec des billes de 3 μm sans fascine (*haut*) et avec 2 μM de fascine (*bas*). Le temps $t = 0$ correspond au début de la polymérisation.

rampe de force décroissante. Il s'explique donc probablement par une plus forte interaction des filaments avec la surface dure des billes nues.

En présence de fascine, le comportement est radicalement différent (FIGURE 5.14 - *Bas*). Au moment de l'augmentation brusque de force, le système est légèrement comprimé de $X_1 = 60$ nm (alors que $X_1 = 130$ nm sans fascine). Cela est encore une fois cohérent avec les mesures mécaniques. Puis, sous une force de 55 pN, la vitesse d'écartement n'est pas tout à fait nulle. Enfin, lorsque la force est ramenée à sa valeur d'origine, le système est décompressé de $X_2 = 25$ nm seulement et les billes recommencent à s'écarter avec une vitesse sensiblement égale à la vitesse mesurée pendant la période initiale.

Entre la fin de la période initiale de faible force et le début de la période finale de faible force la distance centre à centre des billes diminue de $X_2 - X_1 = -35$ nm. Cet écart est quasiment identique au décalage observé entre la rampe décroissante et la rampe croissante des courbes force - distance. Il est donc trop faible pour affirmer que les filaments ont dépolymérisé durant la période de force élevée. En revanche, l'écart avec la droite extrapolée de la période initiale de faible force est conséquent puisqu'il vaut $\Delta X = 160$ nm. Le comportement observé est donc très éloigné du modèle entropique.

Une séquence identique de force faible - forte - faible a été répétée sur deux autres échantillons en changeant le temps Δt entre la fin de la période initiale de faible force et le début de la période finale de même force (TABLE 5.1). Sur les 3 expériences, $X_2 - X_1$ varie entre -35 nm et $+10$ nm. Cela reste petit devant ΔX , qui varie de 135 nm à 160 nm. D'autre part, les variations de $X_2 - X_1$ sont indépendantes de Δt alors que ΔX augmente de façon linéaire avec Δt .

Δt (s)	$X_2 - X_1$ (nm)	ΔX (nm)
330	-10	135
400	+10	150
460	-35	160

TABLE 5.1 – Décalage $X_2 - X_1$ et ΔX de la distance surface à surface pour plusieurs séquences de force faible - forte - faible en fonction du temps sous force forte.

Le fait que la distance entre les billes dépende désormais de l'histoire de la force permet de conclure que la vitesse de polymérisation des filaments dépend de la force appliquée. Le fait que $X_2 - X_1 \sim 0$ suggère qu'une force de 50 pN a permis de stopper la croissance de certains faisceaux au moins.

5.3.5 Efficacité de la génération de force

On a établi dans les paragraphes précédents que la fascine confère aux faisceaux d'actine une grande rigidité qui rend leur comportement sous charge très différent de celui des filaments isolés. On peut maintenant se poser la question de l'efficacité de ce nouveau système à générer des forces. On

définit l'efficacité comme la capacité du système à repousser la charge qui lui est appliquée avec une vitesse élevée. Autrement dit, pour comparer l'efficacité des systèmes avec et sans fascine, on compare leur profil vitesse - force obtenu à partir des expériences de suivi cinétique à force constante (FIGURE 5.15 - *Haut*). On s'attendrait à ce que la rigidité des faisceaux les rende plus efficaces à générer des forces que les filaments isolés. Cela se traduirait par un profil vitesse - force avec fascine au-dessus de celui sans fascine.

Dans les deux cas, le profil tend à force faible vers la vitesse de polymérisation des filaments en solution et à force élevée vers une vitesse nulle, sans jamais traverser l'axe des abscisses. Lorsqu'on superpose les graphes, les deux profils sont, au bruit de mesure près, strictement confondus (FIGURE 5.15 - *Bas*).

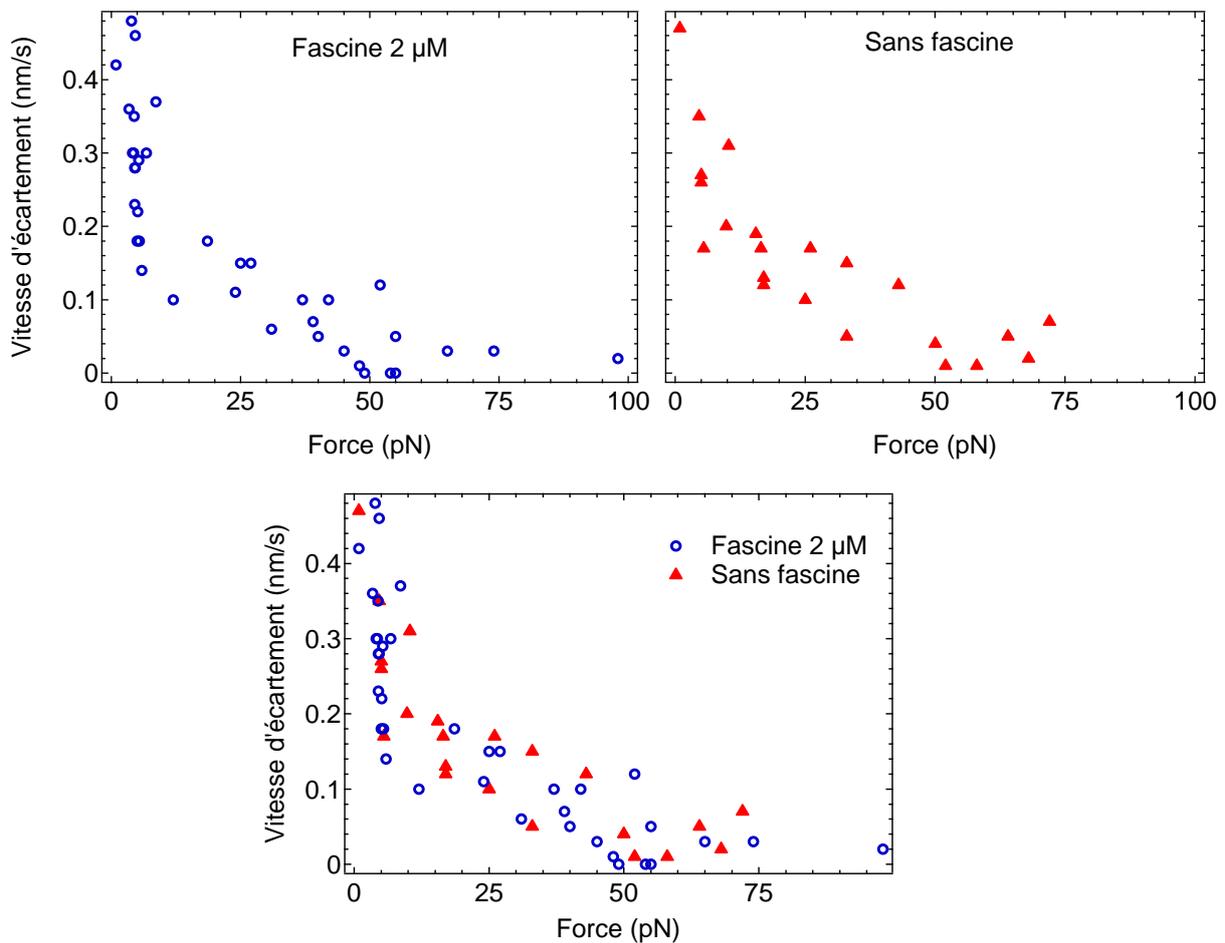


FIGURE 5.15 – *Haut* : Comparaison des profil vitesse - force avec et sans fascine. *Bas* : Superposition des deux profils.

Le résultat présenté ici contraste avec les mesures mécaniques décrites dans les paragraphes précédents. Le système fluctuant sans fascine et le système rigide avec fascine ont la même efficacité.

La conclusion qui en ressort est étonnante. On a montré que les faisceaux d'actine et les filaments isolés ont un comportement profondément différent. Le premier système est très rigide, le second très fluctuant. Pourtant, ils ont le même profil vitesse - force. La mesure du profil vitesse - force ne semble donc pas très adaptée pour discriminer les types de mécanismes en jeu dans la génération de force.

5.4 Mécanisme de génération de force

Les données expérimentales collectées au cours des paragraphes précédents vont maintenant nous permettre de discuter du mécanisme à l'origine de la force générée par les faisceaux de filaments.

5.4.1 Description par le modèle entropique

Le profil vitesse - force des faisceaux et des filaments isolés étant confondus, l'ajustement par le modèle entropique fonctionne très bien (FIGURE 5.16). Néanmoins, plusieurs caractéristiques essentielles du modèle entropique ne sont pas vérifiées avec les faisceaux : (i) les courbes force - distance ne dépendent pas du nombre de filaments dans la zone de contact ; (ii) la longueur des faisceaux n'est pas indépendante de l'histoire de la force appliquée au système ; (iii) la formation de faisceaux rigides n'est pas compatible avec la liberté d'orientation requise pour que le modèle entropique s'applique.

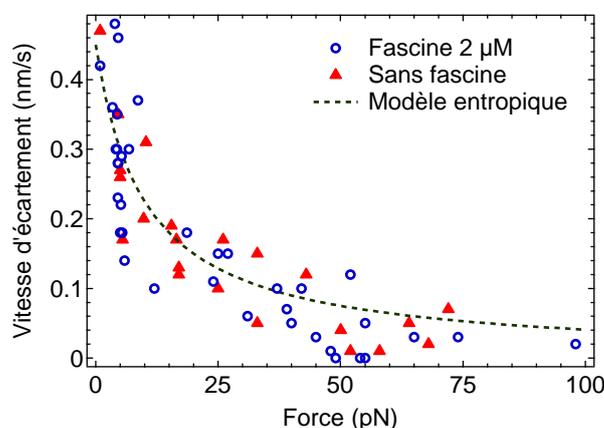


FIGURE 5.16 – Ajustement des profils vitesse - force avec et sans fascine par le modèle entropique. Le paramètre c vaut $c = 0.3$.

5.4.2 Description naïve par le *Brownian ratchet*

Puisque la longueur des faisceaux d'actine semble dépendre de la force appliquée, le modèle du *Brownian ratchet* apparaît bien adapté pour décrire leur comportement. On essaie dans un premier temps d'ajuster le profil - vitesse force avec l'expression analytique présentée au paragraphe 3.8.1 :

$v = \delta \left[Ck_{\text{on}} \exp\left(-\frac{F\delta}{Nk_B T}\right) - k_{\text{off}} \right]$ [Peskin et al., 1993]. Le meilleur fit est obtenu avec un nombre $N = 30$ de filaments impliqués dans la génération de force (FIGURE 5.17). L'ajustement du début de la courbe est correct. Mais le modèle prévoit une *stall force* de 50 pN et donc une vitesse négative au-delà, ce qui ne correspond pas aux observations expérimentales. De plus la valeur de N est beaucoup trop faible au regard du nombre de filaments sur une bille.

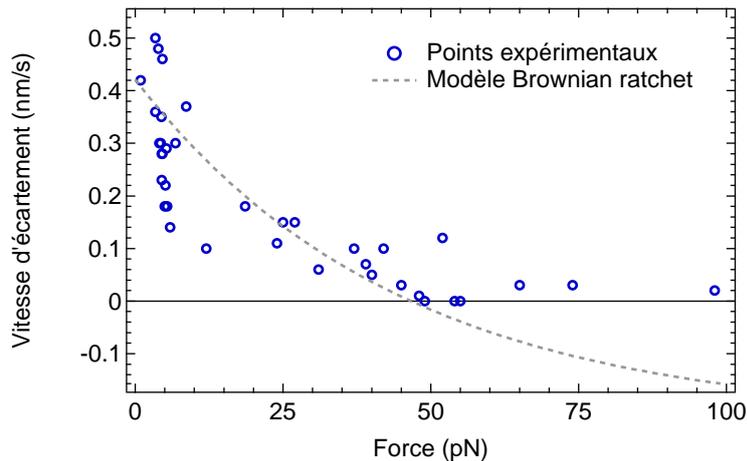


FIGURE 5.17 – Ajustement du profil vitesse - force avec fascine par le modèle du *Brownian ratchet* avec un nombre de filaments $N = 30$.

5.4.3 Description par le *Brownian ratchet* sans partage de la charge

5.4.3.1 Présentation

Les hypothèses du modèle analytique de Peskin et al. [1993] apparaissent trop simples pour décrire correctement le système. Il apparaît trop simplificateur de considérer que la charge F appliquée aux N filaments est rigoureusement répartie de façon équitable sur tous les filaments, ce qui est équivalent à dire que tous les filaments effectuent rigoureusement le même travail face à la charge. En effet, au niveau microscopique, il semble peu physique d'envisager que tous les filaments soient rigoureusement alignés face à la charge, surtout dans la géométrie sphérique où l'on se place.

Il n'existe plus de solution analytique si on introduit un décalage de la position des filaments face à la charge. Nous avons donc réalisé des simulations numériques, pour prévoir de façon plus réaliste le comportement des faisceaux d'actine à la surface des billes de $3 \mu\text{m}$. Le détail du code numérique utilisé est détaillé en Annexe D. Son principe s'inspire du modèle développé par van Doorn et al. [2000], qui reprend et corrige la démarche proposée par Mogilner and Oster [1999]. Les simulations sont réalisées à partir des hypothèses suivantes :

- (i) Le mécanisme de génération de force n'est pas modifié par l'assemblage en faisceaux des filaments, qui sont donc considérés comme indépendants vis à vis de la polymérisation.
- (ii) Les filaments sont rigides et encastrés. Ils polymérisent perpendiculairement à la surface de la bille qui les supporte.
- (iii) La force opposée aux filaments modifie seulement le taux d'addition de monomères d'actine aux extrémités en croissance k_{on} , alors que k_{off} est inchangé. Cette hypothèse est raisonnable si l'on considère les filaments comme incompressibles.
- (iv) Les filaments ont des positions initiales aléatoires. Par conséquent, à chaque instant t la charge n'est supportée que par un filament alors que les autres se situent légèrement en retrait. Dans la description faite par Schaus and Borisy [2008], on se trouve donc dans une situation sans partage de force.

A chaque nouveau pas de temps, les filaments peuvent s'agrandir d'une longueur δ correspondant à la moitié de la taille d'un monomère d'actine. On commence par calculer pour chaque filament la distance l qui le sépare de la paroi opposée.

Si $l \geq \delta$, le filament ne ressent pas l'effet de la charge et polymérise comme s'il était en solution : k_{on} n'est pas modifié.

Si $l < \delta$, le filament doit effectuer un travail $F(\delta - l)$ contre la charge pour s'allonger. Son taux d'addition de monomère diminue et devient $k_{on}^* = k_{on} \exp\left(-\frac{F(\delta - l)}{k_B T}\right)$.

5.4.3.2 Longueur des filaments

La FIGURE 5.18 donne une représentation des filaments à la surface d'une bille après 1000 s de polymérisation à différentes forces. Conformément au modèle, les filaments qui ressentent l'influence de la paroi ont une longueur plus faible que ceux qui poussent à la même vitesse qu'en solution hors de la zone de contact. La longueur de ces filaments diminue quand la force augmente.

Dans cette expérience en géométrie sphérique, la couronne d'actine épouse la forme de la bille opposée. Autrement dit, moins les filaments sont inclinés par rapport à l'axe passant par le centre des billes, plus leur longueur est petite. Ceci est dû au fait que l'addition d'un monomère à l'extrémité d'un filament incliné est plus favorable énergétiquement car elle produit un travail plus faible contre la charge. Cet effet d'inclinaison est similaire à celui discuté par Mogilner and Oster [1996] dans leur modèle de *Brownian ratchet* élastique.

Il faut insister sur le fait que les dessins de la FIGURE 5.18 sont des projections à 2D (*cf.* Annexe D). A 3D, le nombre de filaments devient vite très important dès qu'on s'éloigne de l'axe passant par le centre

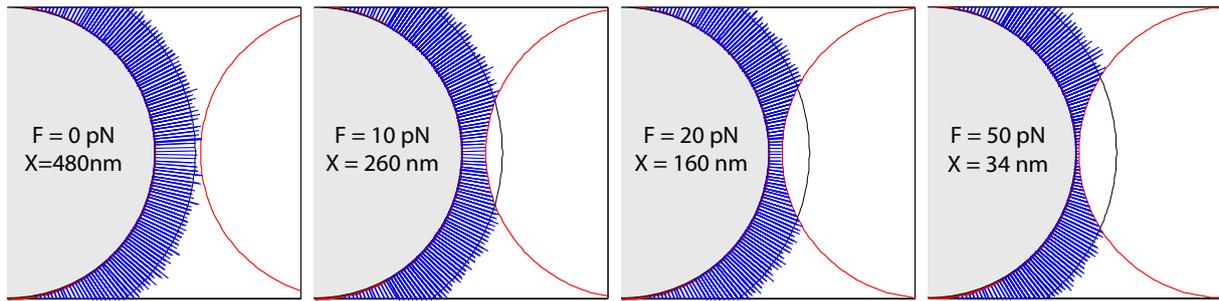


FIGURE 5.18 – Visualisation de la croissance des filaments (bleus) après 1000 s de polymérisation contre une bille nue leur opposant une force constante. Le cercle noir représente la longueur des filaments calculée par l'expression $L(t) = v_0 t = 420$ nm ici. Le nombre de filaments par bille est 17000 (projetés ici à 2D comme expliqué en Annexe D). Le diamètre des billes est $3 \mu\text{m}$, les filaments sont dessinés à l'échelle.

des billes. C'est sans doute ce qui explique que l'on n'observe jamais de vitesse négative dans la gamme de force accessible avec ce système expérimental.

5.4.3.3 Profil vitesse - force

Dans le cadre de ces simulations, on réalise des suivis cinétiques de la polymérisation à force constante pendant 1000 s. La FIGURE 5.19 montre les courbes de distance en fonction du temps obtenues. Elles sont très linéaires, ce qui permet de déduire comme dans les expériences, une vitesse d'écartement des billes en fonction de la force.

On remarque tout de même un régime transitoire au début des courbes qui devient de plus en plus marqué lorsque la force augmente. Il est dû au fait que la vitesse atteint une valeur constante quand un grand nombre de filaments ont rejoint la surface de la bille opposée (*cf.* FIGURE 5.18). Notons que si l'on reproduit exactement le protocole expérimental, c'est à dire qu'on laisse les filaments polymériser à force nulle pendant 600 s avant d'appliquer une force constante, la durée de ce régime transitoire augmente, mais la vitesse en régime stationnaire est inchangée. L'ajustement linéaire pour calculer la vitesse n'est effectué que sur les 500 dernières secondes pour ne pas tenir compte du régime transitoire.

On déduit ainsi un profil vitesse - force qui ajuste bien la courbe expérimentale, y compris à forte force : dans les simulations comme dans l'expérience, la vitesse n'est jamais négative. Le meilleur ajustement est obtenu pour un nombre de filaments par bille de 17000 (FIGURE 5.20). Ce nombre est relativement faible en comparaison du nombre de gelsolines actives sur les billes mesuré en fluorescence (paragraphe 4.6.3). Mais il est du même ordre de grandeur que le nombre de filaments évalué à partir des clichés de microscopie confocale des faisceaux (paragraphe 5.3.2).

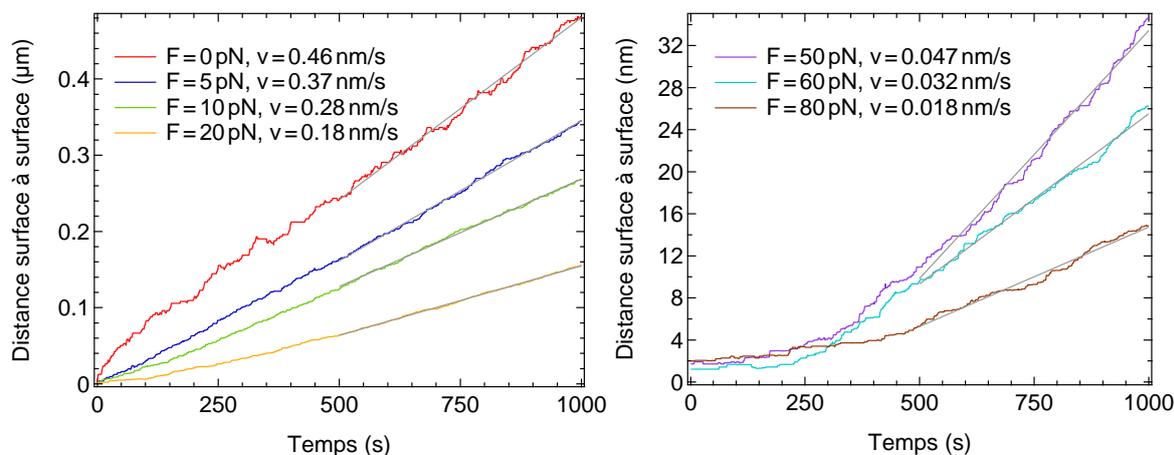


FIGURE 5.19 – Courbes de distance en fonction du temps simulées avec 17000 filaments par bille. L’ajustement linéaire effectué entre 500 et 1000 s pour calculer la vitesse est représenté en gris.

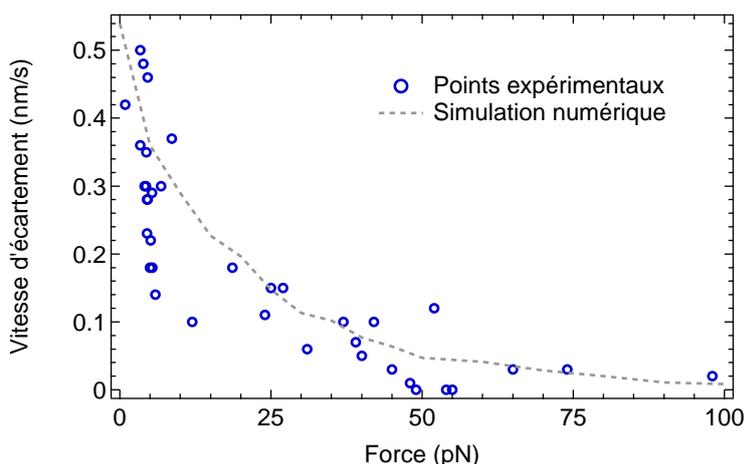


FIGURE 5.20 – Comparaison des profils vitesse - force obtenus expérimentalement avec la fascine, et numériquement avec 17000 filaments par bille.

5.4.3.4 Nombre de filaments proches de la charge

La visualisation des filaments sur les billes permet de mieux comprendre l’existence d’un régime transitoire à temps court sur la FIGURE 5.19 : il faut qu’un certain nombre de filaments arrivent à proximité de la charge pour que la vitesse atteigne son régime stationnaire. Tâchons maintenant de définir ce qu’on entend par proximité. En effet, on se rappelle que dans notre modèle, un seul filament se trouve au contact de la charge à un temps donné. Mais selon la force appliquée, la distribution de la distance des filaments à la paroi évolue. On choisit de considérer comme *proches* de la paroi les filaments dont l’extrémité se trouve à moins de δ de cette paroi, c’est à dire les filaments dont la vitesse de polymérisation est modifiée par la force.

On définit également N_{\max} le nombre maximal de filaments qui pourraient être impliqués dans la génération de force (FIGURE 5.21) : ce sont tous les filaments susceptibles d'être en contact avec la charge si les filaments plus proches de l'axe étaient ralentis. Le rapport du nombre de filaments proches de la paroi à N_{\max} représente la fraction de filaments efficaces.

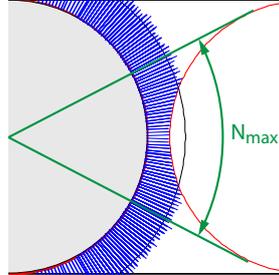


FIGURE 5.21 – Définition du nombre N_{\max} qui peuvent être impliqués dans la génération de force : ce sont tous les filaments situés dans le cône tracé en vert.

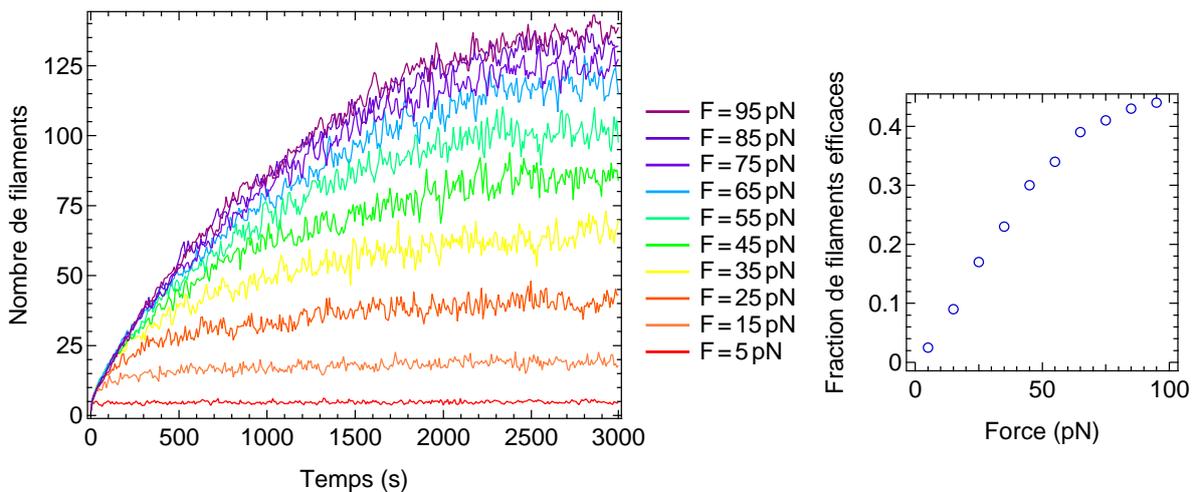


FIGURE 5.22 – *Gauche* : nombre de filaments dont l'extrémité est à moins de δ de la paroi opposée lors de simulations de polymérisation sous force constante. Les courbes sont moyennées sur 10 cycles. Le nombre de filaments par bille est 17000. *Droite* : fraction de filaments au contact de la charge une fois l'équilibre atteint.

La FIGURE 5.22 - *Gauche* représente l'évolution du nombre de filaments proches de la paroi au cours du temps. Ce nombre atteint toujours un plateau, quelle que soit la valeur de la force. On a tracé sur la FIGURE 5.22 - *Droite* le ratio de filaments efficaces au plateau en fonction de la force. Il sature à une valeur de 0.5 à force élevée. De façon intéressante, Tsekouras et al. [2011] prévoient le même comportement en géométrie plane. Ils calculent que la valeur maximale du nombre de filaments en contact de la charge est $1 - \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}C} = 0.65$ dans nos conditions.

Le nombre de filaments au contact de la charge est donc un paramètre critique dans l'efficacité de ce système à générer des forces. En effet le régime transitoire, durant lequel la vitesse n'est pas optimale, correspond au temps nécessaire aux filaments pour atteindre la surface.

5.4.3.5 Application d'une séquence de force

Maintenant qu'on a défini les paramètres qui régissent la génération de force dans le système simulé, examinons son comportement lorsqu'on lui applique une séquence de forces faible - forte - faible. La FIGURE 5.23 montre la courbe obtenue dans des conditions similaires à l'expérience réalisée avec la fascine. Ces conditions sont résumées dans la TABLE 5.2. La différence principale est qu'on a appliqué une faible force de 5 pN dans la simulation pendant les 600 premières secondes alors que le système expérimental est laissé polymériser à force nulle. Comme on l'a dit plus haut, si on laisse les filaments polymériser à force nulle dans la simulation avant d'appliquer une force, le régime transitoire observé sera plus long une fois la force appliquée. Ce régime transitoire est trop long pour mesurer correctement la vitesse durant la première période de faible force.

Période	Expérience		Simulation	
	Force	Vitesse	Force	Vitesse
0 à 600 s	0 pN	-	5 pN	-
600 à 960 s	5.3 pN	0.29 nm/s	10 pN	0.29 nm/s
960 à 1300 s	55 pN	0.05 nm/s	50 pN	0.023 nm/s
1320 à 1650 s	5.1 pN	0.25 nm/s	10 pN	0.32 nm/s

TABLE 5.2 – Récapitulatif des conditions appliquées et de la vitesse mesurée dans l'expérience et dans la simulation.

Dans le système simulé, les filaments sont incompressibles. On ne peut donc pas voir la compression observée à $t = 960$ s dans l'expérience. Pour une meilleure comparaison de la simulation avec l'expérience, on a fait le choix de décaler la courbe simulée vers le bas sur la FIGURE 5.23-*Haut*. Hormis la différence de compressibilité, la simulation reproduit remarquablement bien le comportement observé expérimentalement, surtout le fait que la vitesse est la même avant et après la période de forte force. Cette propriété est contre-intuitive au vu des résultats de simulation exposés plus haut. En effet, on sait que l'application d'une force élevée modifie l'état du système, notamment la longueur des filaments et leur proximité par rapport à la charge. Il y a donc *a priori* peu de chances pour que la vitesse revienne à la même valeur pendant la période finale de force faible.

L'évolution du nombre de filaments dont l'extrémité est proche de la paroi (5.23-*Bas*) aide à comprendre ce résultat étonnant. Durant la première période de faible force, ce nombre est constant, puis

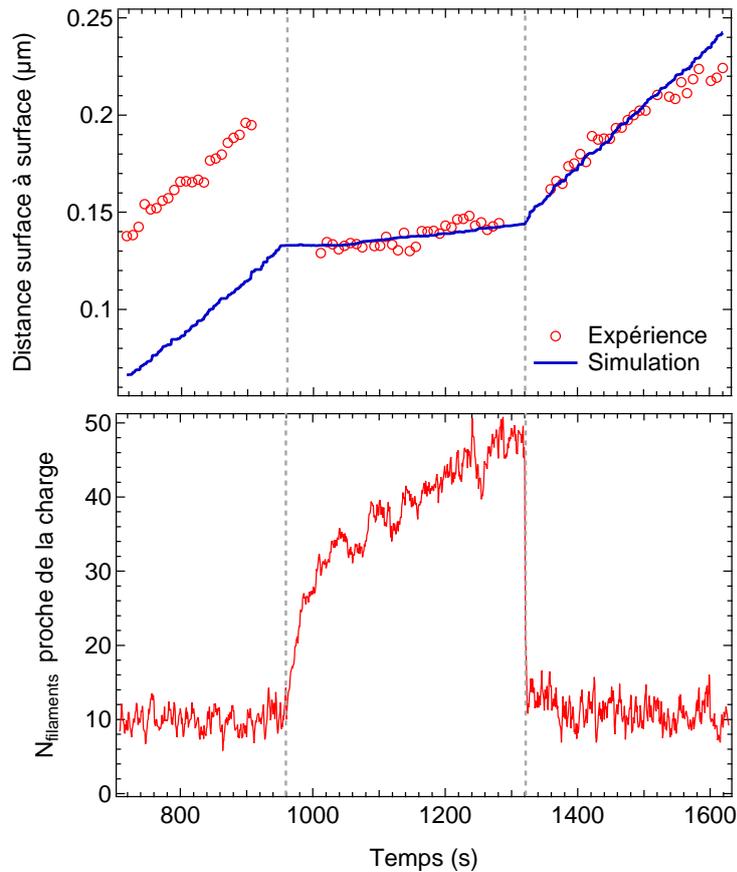


FIGURE 5.23 – *Haut* : simulation d’une séquence de force forte - faible - forte avec 17000 filaments par bille et comparaison avec l’expérience. La courbe simulée est décalée de 0.15 μm vers le bas. *Bas* : nombre de filaments à moins de δ de la paroi dans la simulation (moyenne sur 10 cycles).

il augmente fortement jusqu’à quasiment atteindre un plateau pendant la période de force élevée. Mais lorsque la force est relâchée, il chute aussitôt pour revenir à sa valeur initiale. Notons que la variation de N_{max} pendant la période de force forte est négligeable, de sorte que la fraction de filaments efficaces est elle aussi identique pendant les deux périodes de force faible. En régime stationnaire, le nombre de filaments proches de la paroi, et par conséquent la vitesse, ne dépendent donc pas de l’histoire de la force appliquée au système. Seule la longueur des filaments en dépend.

5.4.4 Conclusion

Les simulations numériques effectuées permettent de proposer un mécanisme de génération de force par les faisceaux de filaments d’actine polymérisant à la surface des billes magnétiques qui ajuste bien les données expérimentales. Ce mécanisme est basé sur un modèle de type *Brownian ratchet* sans partage de la charge. Avec ces hypothèses, la longueur des filaments dépend de la force appliquée et de

leur angle par rapport à la paroi opposée. Le paramètre critique pour l'efficacité de la génération de force par ce système semble être la densité de filaments à la surface des billes. En effet, la fraction de filaments efficaces sature lorsque la force appliquée augmente. Pour augmenter la vitesse à concentration d'actine constante, il faut donc augmenter le nombre total de filaments.

Conclusion sur la pression de croissance des filaments d'actine

Dans cette partie, nous avons repris et amélioré un dispositif expérimental permettant de mesurer la force générée par une petite population de filaments d'actine dont on peut faire varier l'organisation de façon contrôlée. Dans ce système qui modélise le cytosquelette d'actine dans une cellule en train de migrer, les filaments sont ancrés sur une paroi et exercent une force contre une charge qui leur fait face. Le point d'ancrage peut être totalement souple, autorisant les filaments à s'orienter librement, ou au contraire rigide, forçant les filaments à polymériser dans la direction de la charge.

Coraline Brangbour a développé et analysé le système expérimental dans lequel les filaments sont libres de s'orienter [Brangbour, 2008]. Une expérience complémentaire dans les mêmes conditions nous a permis de démontrer que dans cette situation la longueur des filaments est indépendante de la force appliquée. Ceci prouve que la force générée peut être décrite par le modèle entropique : les filaments ne sont en moyenne pas au contact de la charge et polymérisent comme s'ils étaient en solution. C'est l'entropie de configuration orientationnelle qui est à l'origine de la force engendrée.

Pour rendre possible la mesure de force générée par des faisceaux rigides de filaments d'actine, nous avons développé un second système à partir de celui de Coraline Brangbour. Nous avons montré que les fluctuations d'orientation sont supprimées dans ce cas et que la structure obtenue est très rigide. La propriété essentielle de ce système est que la longueur des filaments dépend de la force appliquée. Grâce au contrôle de la géométrie, nous avons donc mesuré pour la première fois l'effet de la force sur la vitesse de polymérisation de filaments d'actine.

Le mécanisme de génération de force dans ces conditions est radicalement différent. Nous avons établi à l'aide de simulations numériques qu'un modèle basé sur le *Brownian ratchet* dans lequel la charge n'est pas partagée permet de décrire la force générée dans ces conditions. Force générée et géométrie

sont intimement liés dans ce modèle et on a dégagé un critère important pour la génération de force : le nombre de filaments à proximité de la charge.

Malgré une origine physique de la force générée complètement différente dans le cadre de ces deux mécanismes, le profil vitesse - force est identique à densité de filaments et concentration d'actine fixés. Il semble donc que le profil vitesse - force ne soit pas un critère déterminant pour remonter au mécanisme de génération de force. L'efficacité du réseau d'actine à générer des forces dans notre système semble donc dépendre essentiellement de la concentration de monomères et de la densité de filaments près de la charge mais semble relativement indépendante de l'organisation.

Les deux configurations étudiées sont des visions idéales opposées qui présentent l'avantage de pouvoir être décrites par des modèles théoriques. La réalité physiologique est certainement intermédiaire et ces deux mécanismes de génération de force oeuvrent de façon complémentaire. Notre système expérimental est bien adapté pour explorer comment les protéines régulatrices agissent sur la façon dont ces deux mécanismes sont mélangés *in vivo*. Il serait par exemple intéressant d'introduire une forme de branchement dans le système pour tester l'influence d'un nombre de filaments variant au cours du temps sur la génération de force. On pourrait aussi envisager d'étudier comment la génération de force évolue lorsque la dynamique d'élongation des filaments est modifiée par des protéines telles que des formines.

Influence de la diffusion dans le système expérimental

La réaction de polymérisation de l'actine sur les billes se fait dans une géométrie très hétérogène. En effet, tous les monomères d'actine dans un capillaire sont assemblés en filaments dans une fine couche dont l'épaisseur, égale au diamètre des billes, est petite devant la hauteur $l = 100 \mu\text{m}$ du capillaire. Il y a donc lieu de vérifier que la diffusion de monomères vers le fond du capillaire n'est pas limitante pour la réaction de polymérisation des filaments sur les billes.

La distance entre les billes est de quelques μm , ce qui reste petit devant l . Le réacteur que constitue le capillaire peut donc être modélisé comme une surface absorbant de façon homogène les monomères qui arrivent à son contact surmontée d'une épaisseur de fluide l où les monomères ne sont soumis qu'à la diffusion. On restreint ainsi le problème à une seule dimension spatiale x (FIGURE C.1). En un point x du fluide, la concentration de monomères d'actine est $C_x(t)$ et leur flux vers le fond est $j_x(t)$.

Soit b le nombre de monomères d'actine par unité de surface absorbés par le fond du capillaire, c'est à dire le nombre de monomères sous forme de filaments sur les billes. La conservation de la masse impose que $\frac{db}{dt} = -j_{x=0}(t)$. Plus précisément, la réaction de polymérisation entraîne :

$$\frac{db}{dt} = N_{\text{fils}} k_{\text{on}} (C_{x=0} - C_C) \quad (\text{C.1})$$

Le nombre de filaments en croissance par unité de surface est : $N_{\text{fils}} = N_{\text{billes}}^S \times N_{\text{gs/bille}}$ où N_{billes}^S est la

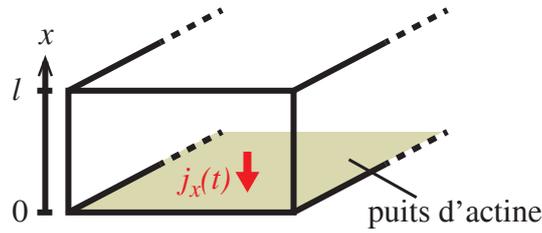


FIGURE C.1 – Modélisation de la diffusion dans le capillaire.

concentration surfacique en billes et $N_{\text{gs/bille}} \sim 50000$ est le nombre de gelsolines par billes. N_{billes}^S peut être calculé à partir de la concentration volumique en billes introduites N_{billes}^V . Une fois que ces billes ont sédimenté au fond du capillaire, $N_{\text{billes}}^S = N_{\text{billes}}^V l$.

Or d'après la loi de Fick :

$$j_{x=0}(t) = -D \left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (\text{C.2})$$

En combinant (C.1) et (C.2), on obtient :

$$\left. \frac{\partial C}{\partial x} \right|_{x=0} = \frac{1}{h} (C_{x=0} - C_C) \quad \text{avec} \quad h = \frac{D}{N_{\text{billes}}^V N_{\text{gs/bille}} k_{\text{on}} l} \quad (\text{C.3})$$

Le paramètre h a la dimension d'une longueur décrivant la compétition entre la diffusion de monomères et la vitesse de réaction dans le système. On peut voir h comme la taille caractéristique du gradient de concentration en actine qui s'établit à cause de la réaction. Avec les valeurs numériques données plus haut, $h = 3\text{mm} \gg l$. La diffusion est beaucoup plus rapide que la réaction et l'on peut considérer la concentration en monomères d'actine homogène sur toute la hauteur du capillaire : $C_x(t) = C(t)$.

Ainsi, tous les phénomènes de diminution de la vitesse de polymérisation des filaments d'actine qu'on observe expérimentalement ne sont pas des artefacts dus à la diffusion des monomères. Ce sont bien des effets de la charge sur la réaction de polymérisation.

Simulation numérique du *Brownian ratchet*

Le modèle de van Doorn et al. [2000] dont s'inspire cette simulation a été développé en géométrie plane. Il a donc été adapté à la géométrie sphérique. Le système est constitué d'une bille sur laquelle polymérisent des filaments d'actine, au contact d'une bille nue qui leur oppose une force F . En remarquant que le système est invariant par rotation d'angle φ autour de l'axe du doublet de billes (FIGURE D.1), on se ramène à une géométrie circulaire par projection dans le plan. Le paramètre pertinent est donc l'angle θ que forment les filaments avec cet axe.

La projection doit être effectuée en conservant la densité surfacique de filaments n_S . Les filaments sont distribués dans un cône d'angle θ_{\max} choisi suffisamment grand pour que les filaments situés à θ_{\max} soient toujours en-dehors de la zone de contact. L'intervalle $[0, \theta_{\max}]$ est ensuite discrétisé avec un pas $d\theta$. A chaque angle θ_i sur la projection 2D, on place autant de filaments qu'on en dénombre sur l'anneau d'angle θ_i et de largeur $d\theta$ sur la sphère (en rouge sur la FIGURE D.1). Ce nombre est $N(\theta_i) = n_S 2\pi R^2 \sin(\theta_i) d\theta$. Le nombre total de filaments est N . A titre indicatif, pour 17000 filaments par bille (qui est la valeur utilisée pour ajuster les données expérimentales) et $d\theta = 2^\circ$, il n'y a qu'un filament à $\theta = 0$, mais 35 filaments à $\theta = 20^\circ$.

Au temps $t = 0$, la longueur initiale des filaments est choisie aléatoirement dans l'intervalle $[0, \delta]$. Puis la bille nue est positionnée au plus près possible de la bille couverte d'actine sans qu'elle pénètre de filaments et l'écart initial entre les surfaces des 2 billes selon leur axe est calculé.

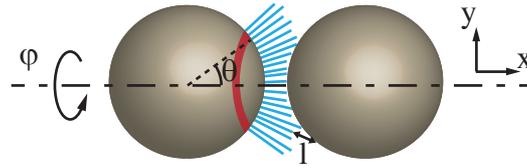


FIGURE D.1 – Modélisation de la croissance de filaments sur une bille magnétique dans le cadre de la simulation numérique du *Brownian ratchet*.

Un modèle stochastique de cinétique chimique [Gillespie, 2007] permet ensuite de simuler la polymérisation des filaments au cours du temps. A chaque pas de temps $d\tau = 0.8$ s, on tire N fois au hasard un filament et l'on calcule sa distance l à la bille nue dans sa direction θ (FIGURE D.1).

Si $l \geq \delta$, le filament peut s'allonger d'une longueur δ correspondant à la taille d'un monomère d'actine avec une probabilité $k_{\text{on}}Cd\tau$. Dans un deuxième temps, il peut être raccourci d'une longueur δ avec une probabilité $k_{\text{off}}d\tau$. Ce filament polymérise donc comme s'il était en solution : il ne ressent pas la charge.

Si $l < \delta$, la probabilité de s'allonger du filament devient $k_{\text{on}}Cd\tau \exp\left(-\frac{F(\delta-l)}{k_{\text{B}}T}\right)$, alors que sa probabilité de se raccourcir est inchangée. Si à l'issue de ces 2 étapes le filament s'est allongé, il a alors repoussé la bille nue d'une distance $(\delta-l)\cos\theta$.

A la fin de chaque pas de temps, la distance surface à surface des billes est enregistrée, ce qui permet de reconstituer des courbes distance - temps similaires à celles obtenues expérimentalement.

Bibliographie

- Aratyn, Y. S., Schaus, T. E., Taylor, E. W., and Borisy, G. G. (2007). Intrinsic dynamic behavior of fascin in filopodia. *Molecular Biology of the Cell*, 18(10) :3928–3940.
- Bernheim-Groswasser, A., Prost, J., and Sykes, C. (2005). Mechanism of actin-based motility : A dynamic state diagram. *Biophysical Journal*, 89(2) :1411–1419.
- Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., Kovar, D. R., and Martiel, J.-L. (2007). Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophysical Journal*, 92(7) :2546–2558.
- Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A., and Pollard, T. D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by arp2/3 complex and wasp/scar proteins. *Nature*, 404(6781) :1007–1011.
- Borisy, G. G. and Svitkina, T. M. (2000). Actin machinery : pushing the envelope. *Current Opinion In Cell Biology*, 12(1) :104–112.
- Brangbour, C. (2008). *Force générée par la polymérisation de filaments d'actine*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).
- Brangbour, C., du Roure, O., Helfer, E., Demoulin, D., Mazurier, A., Fermigier, M., Carlier, M. F., Bibette, J., and Baudry, J. (2011). Force-velocity measurements of a few growing actin filaments. *Plos Biology*, 9(4) :e1000613.
- Bryan, J. and Kane, R. E. (1978). Separation and interaction of major components of sea-urchin actin gel. *Journal of Molecular Biology*, 125(2) :207–224.

BIBLIOGRAPHIE

- Cameron, L. A., Footer, M. J., van Oudenaarden, A., and Theriot, J. A. (1999). Motility of acta protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9) :4908–4913.
- Cameron, L. A., Robbins, J. R., Footer, M. J., and Theriot, J. A. (2004). Biophysical parameters influence actin-based movement, trajectory, and initiation in a cell-free system. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5) :2312–2323.
- Carlier, M. F. and Pantaloni, D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *Journal of Molecular Biology*, 269(4) :459–467.
- Carlsson, A. E. (2001). Growth of branched actin networks against obstacles. *Biophysical Journal*, 81(4) :1907–1923.
- Carlsson, A. E. (2003). Growth velocities of branched actin networks. *Biophysical Journal*, 84(5) :2907–2918.
- Chaudhuri, O., Parekh, S. H., and Fletcher, D. A. (2007). Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445(7125) :295–298.
- Claessens, M. M. A. E., Bathe, M., Frey, E., and Bausch, A. R. (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate f-actin bundle stiffness. *Nature Materials*, 5(9) :748–753.
- Claessens, M. M. A. E., Semmrich, C., Ramos, L., and Bausch, A. R. (2008). Helical twist controls the thickness of f-actin bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26) :8819–8822.
- Courson, D. S. and Rock, R. S. (2010). Actin cross-link assembly and disassembly mechanics for alpha-actinin and fascin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34) :26350–26357.
- Crocker, J. C. and Grier, D. G. (1996). Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1) :298–310.
- Dabiri, G. A., Sanger, J. M., Portnoy, D. A., and Southwick, F. S. (1990). *Listeria-monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16) :6068–6072.
- Discher, D. E., Janmey, P., and Wang, Y. L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751) :1139–1143.

- Ditsch, A. and Wegner, A. (1994). Nucleation of actin polymerization by gelsolin. *European Journal of Biochemistry*, 224(1) :223–227.
- Dogterom, M. and Yurke, B. (1997). Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science*, 278(5339) :856–860.
- Dreyfus, R., Lacoste, D., Bibette, J., and Baudry, J. (2009). Measuring colloidal forces with the magnetic chaining technique. *European Physical Journal E*, 28(2) :113–123.
- Ferrer, J. M., Lee, H., Chen, J., Pelz, B., Nakamura, F., Kamm, R. D., and Lang, M. J. (2008). Measuring molecular rupture forces between single actin filaments and actin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27) :9221–9226.
- Feynman, R., Leighton, R., and Sands, M. (1963). *Ratchet and pawl. The Feynman lectures on physics*, volume 1. Addison-Wesley, USA.
- Fletcher, D. A. and Mullins, D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280) :485–492.
- Footer, M. J., Kerssemakers, J. W. J., Theriot, J. A., and Dogterom, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7) :2181–2186.
- Fraser, R. D. and Macrae, T. P. (1980). Molecular structure and mechanical properties of keratins. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 34 :211–46.
- Gerbal, F., Chaikin, P., Rabin, Y., and Prost, J. (2000). An elastic analysis of listeria monocytogenes propulsion. *Biophysical Journal*, 79(5) :2259–2275.
- Giardini, P. A., Fletcher, D. A., and Theriot, J. A. (2003). Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11) :6493–6498.
- Gillespie, D. T. (2007). Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58 :35–55.
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin-filaments measured from thermal fluctuations in shape. *Journal of Cell Biology*, 120(4) :923–934.

BIBLIOGRAPHIE

- Greene, G. W., Anderson, T. H., Zeng, H., Zappone, B., and Israelachvili, J. N. (2009). Force amplification response of actin filaments under confined compression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2) :445–449.
- Hagerman, P. J. (1988). Flexibility of d.n.a. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 17 :265–286.
- Haviv, L., Gov, N., Ideses, Y., and Bernheim-Groswasser, A. (2008). Thickness distribution of actin bundles in vitro. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 37(4) :447–454.
- Heinemann, F., Doschke, H., and Radmacher, M. (2011). Keratocyte lamellipodial protrusion is characterized by a concave force-velocity relation. *Biophysical Journal*, 100(6) :1420–1427.
- Heins, S., Wong, P. C., Muller, S., Goldie, K., Cleveland, D. W., and Aebi, U. (1993). The rod domain of nf-l determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *Journal of Cell Biology*, 123(6) :1517–1533.
- Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*. Elsevier Academic Press Inc.
- Hill, T. L. (1981). Microfilament or microtubule assembly or disassembly against a force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-biological Sciences*, 78(9) :5613–5617.
- Hill, T. L. and Kirschner, M. W. (1982). Bioenergetics and kinetics of microtubule and actin filament assembly-disassembly. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology*, 78 :1–125.
- Hohenadl, M., Storz, T., Kirpal, H., Kroy, K., and Merkel, R. (1999). Desmin filaments studied by quasi-elastic light scattering. *Biophysical Journal*, 77(4) :2199–2209.
- Howard, J. (2001). *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Inoue, S. and Salmon, E. D. (1995). Force generation by microtubule assembly disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell*, 6(12) :1619–1640.
- Isambert, H., Venier, P., Maggs, A. C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1995). Flexibility of actin-filaments derived from thermal fluctuations - effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19) :11437–11444.

- Ishikawa, R., Sakamoto, T., Ando, T., Higashi-Fujime, S., and Kohama, K. (2003). Polarized actin bundles formed by human fascin-1 : their sliding and disassembly on myosin ii and myosin v in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 87(3) :676–685.
- Israelachvili, J. N. (1973). Thin-film studies using multiple-beam interferometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 44(2) :259–272.
- Jansen, S., Collins, A., Yang, C. S., Rebowski, G., Svitkina, T., and Dominguez, R. (2011). Mechanism of actin filament bundling by fascin. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34) :30087–30096.
- Koenig, A., Hebraud, P., Gosse, C., Dreyfus, R., Baudry, J., Bertrand, E., and Bibette, J. (2005). Magnetic force probe for nanoscale biomolecules. *Physical Review Letters*, 95(12) :128301.
- Koestler, S. A., Auinger, S., Vinzenz, M., Rottner, K., and Small, J. V. (2008). Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nature Cell Biology*, 10(3) :306–U33.
- Kouyama, T. and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of "n-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled f-actin - local structural-change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy-meromyosin. *European Journal of Biochemistry*, 114(1) :33–38.
- Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41) :14725–14730.
- Kuhne, T., Lipowsky, R., and Kierfeld, J. (2009). Zipping mechanism for force generation by growing filament bundles. *Epl*, 86(6) :68002.
- Kureishy, N., Sapountzi, V., Prag, S., Anilkumar, N., and Adams, J. C. (2002). Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays*, 24(4) :350–361.
- Leal Calderon, F., Stora, T., Mondain-Monval, O., Poulin, P., and Bibette, J. (1994). Direct measurement of colloidal forces. *Physical Review Letters*, 72(18) :2959–2962.
- Lee, K. C. and Liu, A. J. (2008). New proposed mechanism of actin-polymerization-driven motility. *Biophysical Journal*, 95(10) :4529–4539.
- Lee, K. C. and Liu, A. J. (2009). Force-velocity relation for actin-polymerization-driven motility from brownian dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 97(5) :1295–1304.

BIBLIOGRAPHIE

- Li, D. C., Lam, C. N., and Biswal, S. L. (2010). Measuring short-range repulsive forces by imaging directed magnetic-particle assembly. *Soft Matter*, 6(2) :239–242.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2003). *Molecular cell biology*. Freeman, W.H., New York, 5th edition.
- Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of listeria and shigella using pure proteins. *Nature*, 401(6753) :613–616.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M. F., and Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion : A direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16) :5992–5997.
- Matsudaira, P. (1994). Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Seminars in cell biology*, 5(3) :165–74.
- McGrath, J. L., Eungdamrong, N. J., Fisher, C. I., Peng, F., Mahadevan, L., Mitchison, T. J., and Kuo, S. C. (2003). The force-velocity relationship for the actin-based motility of listeria monocytogenes. *Current Biology*, 13(4) :329–332.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991) :237–242.
- Mogilner, A. and Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophysical Journal*, 71(6) :3030–3045.
- Mogilner, A. and Oster, G. (1999). The polymerization ratchet model explains the force-velocity relation for growing microtubules. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 28(3) :235–242.
- Mogilner, A. and Oster, G. (2003). Force generation by actin polymerization ii : The elastic ratchet and tethered filaments. *Biophysical Journal*, 84(3) :1591–1605.
- Oliver, T., Dembo, M., and Jacobson, K. (1995). Traction forces in locomoting cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 31(3) :225–240.
- Ono, S., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsudaira, P. T., Gnarra, J. R., Obinata, T., and Matsumura, F. (1997). Identification of an actin binding region and a protein kinase c phosphorylation site on human fascin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4) :2527–2533.

- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M. F. (2000). The arp2/3 complex branches filament barbed ends : functional antagonism with capping proteins. *Nature Cell Biology*, 2(7) :385–391.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2001). Cell biology - mechanism of actin-based motility. *Science*, 292(5521) :1502–1506.
- Parekh, S. H., Chaudhuri, O., Theriot, J. A., and Fletcher, D. A. (2005). Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nature Cell Biology*, 7(12) :1219–1223.
- Peskin, C. S., Odell, G. M., and Oster, G. F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations - the brownian ratchet. *Biophysical Journal*, 65(1) :316–324.
- Philip, J., Gnanaprakash, G., Jayakumar, T., Kalyanasundaram, P., and Raj, B. (2003). Three distinct scenarios under polymer, surfactant, and colloidal interaction. *Macromolecules*, 36(24) :9230–9236.
- Prass, M., Jacobson, K., Mogilner, A., and Radmacher, M. (2006). Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *Journal of Cell Biology*, 174(6) :767–772.
- Ranjith, P., Mallick, K., Joanny, J. F., and Lacoste, D. (2010). Role of atp-hydrolysis in the dynamics of a single actin filament. *Biophysical Journal*, 98(8) :1418–1427.
- Schaus, T. E. and Borisy, G. G. (2008). Performance of a population of independent filaments in lamellipodial protrusion. *Biophysical Journal*, 95(3) :1393–1411.
- Schreiber, C. H., Stewart, M., and Duke, T. (2010). Simulation of cell motility that reproduces the force-velocity relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20) :9141–9146.
- Shaevitz, J. W. and Fletcher, D. A. (2007). Load fluctuations drive actin network growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40) :15688–15692.
- Shevkoplyas, S. S., Siegel, A. C., Westervelt, R. M., Prentiss, M. G., and Whitesides, G. M. (2007). The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field. *Lab On A Chip*, 7(10) :1294–1302.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium : where motility begins. *Trends In Cell Biology*, 12(3) :112–120.

BIBLIOGRAPHIE

- Spudich, J. A. and Watt, S. (1971). Regulation of rabbit skeletal muscle contraction.1. biochemical studies of interaction of tropomyosin-troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin. *Journal of Biological Chemistry*, 246(15) :4866–4871.
- Svitkina, T. (2007). Electron microscopic analysis of the leading edge in migrating cells. *Cellular Electron Microscopy*, 79 :295–319.
- Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M., and Borisy, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *Journal of Cell Biology*, 160(3) :409–421.
- Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., and Borisy, G. G. (1995). Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells. *Journal of Structural Biology*, 115(3) :290–303.
- Theriot, J. A. (2000). The polymerization motor. *Traffic*, 1(1) :19–28.
- Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. (1989). Actin-filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, listeria-monocytogenes. *Journal of Cell Biology*, 109(4) :1597–1608.
- Tsekouras, K., Lacoste, D., Mallick, K., and Joanny, J. F. (2011). Condensation of actin filaments pushing against a barrier. *New Journal of Physics*, 13 :103032.
- van Doorn, G. S., Tanase, C., Mulder, B. M., and Dogterom, M. (2000). On the stall force for growing microtubules. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 29(1) :2–6.
- van Ommering, K., Lamers, C. C. H., Nieuwenhuis, J. H., van IJzendoorn, L. J., and Prins, M. W. J. (2009). Analysis of individual magnetic particle motion near a chip surface. *Journal of Applied Physics*, 105(10) :104905.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *Journal of Molecular Biology*, 108(1) :139–150.
- Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (2003). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, 160(3) :387–398.
- Zhang, H. and Widom, M. (1995). Field-induced forces in colloidal particle chains. *Physical Review E*, 51(3) :2099–2103.

CHAPITRE 6

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons dans une première partie caractérisé un matériau qui nous a servi d'outil pour mesurer dans une seconde partie la force générée par les filaments d'actine : les colloïdes superparamagnétiques.

La première partie consiste à montrer comment le couplage d'un grain superparamagnétique avec un champ peut être transposé à l'échelle d'une bille magnétique et explique l'existence d'un couplage magnétique mésoscopique dans cette bille.

Nous avons réalisé une étude complète des propriétés magnétiques de billes de taille différente, en commençant par caractériser le ferrofluide qui a servi par la suite à les fabriquer.

Cette caractérisation a été réalisée en utilisant une mesure d'anisotropie optique, inspirée de mesures réalisées dans la littérature sur les ferrofluides. Nous avons fait évoluer le dispositif expérimental pour l'adapter aux contraintes propres aux billes et s'affranchir du phénomène de chaînage.

Le couplage magnétique des billes a été envisagé à la lumière de deux modèles. Dans le premier, le couplage est expliqué par l'assemblée aléatoire de petits grains de la bille. Le couplage ainsi calculé n'est pas assez fort pour expliquer les résultats expérimentaux. Un second modèle montre que le couplage est dominé par la présence d'un moment permanent dans les billes correspondant à quelques gros grains. La robustesse de ce modèle tient à ce qu'il est généralisable à toutes les tailles de billes magnétiques étudiées et s'appuie sur les propriétés du ferrofluide, notamment sa polydispersité.

La technique expérimentale développée pour comprendre le couplage magnétique des billes dans un champ constitue un nouveau moyen de caractérisation puissant. Il permet d'envisager le développement de nouvelles particules aux propriétés adaptées à une application précise en changeant la distribution de taille du ferrofluide utilisé pour les fabriquer.

Dans la seconde partie, nous avons repris et amélioré un dispositif expérimental permettant de mesurer la force générée par une petite population de filaments d'actine dont on peut faire varier l'organisation de façon contrôlée. Dans ce système qui modélise le cytosquelette d'actine dans une cellule en train de migrer, les filaments sont ancrés sur une paroi et exercent une force contre une charge qui leur fait face. Le point d'ancrage peut être totalement souple, autorisant les filaments à s'orienter librement, ou au contraire rigide, forçant les filaments à polymériser en direction de la charge. Ces deux configurations sont des visions idéales opposées qui présentent l'avantage de pouvoir être décrites par des modèles théoriques.

Dans la première situation, nous avons démontré que la longueur des filaments est indépendante de la force appliquée et que par conséquent la force générée est bien décrite par le modèle entropique.

Pour supprimer les fluctuations d'orientation, les filaments d'actine sont assemblés en faisceaux. Nous avons caractérisé ce système et montré que dans ce cas la structure obtenue est très rigide. La propriété essentielle de ce nouveau système est que la longueur des filaments dépend de la force appliquée. Grâce au contrôle de la géométrie, nous avons donc mesuré pour la première fois l'effet de la force sur la vitesse de polymérisation de filaments d'actine.

Des simulations numériques ont permis de développer un modèle basé sur le *Brownian ratchet* dans lequel la charge n'est pas partagée pour décrire la force générée dans ces conditions. Force générée et géométrie sont intimement liés dans ce modèle et on a dégagé un critère important pour la génération de force : le nombre de filaments à proximité de la charge.

Malgré une origine physique de la force générée complètement différente pour ces deux mécanismes, le profil vitesse - force est identique à densité de filaments et concentration d'actine fixés. L'efficacité du réseau d'actine à générer des forces dans notre système semble dépendre essentiellement de la concentration de monomères et de la densité de filaments près de la charge mais elle semble être relativement indépendante de l'organisation.

Les deux configurations étudiées sont des visions idéales opposées qui présentent l'avantage de pouvoir être décrites par des modèles théoriques. La réalité physiologique est certainement intermédiaire et ces deux mécanismes de génération de force oeuvrent de façon complémentaire. Notre système expérimental est bien adapté pour explorer comment les protéines régulatrices agissent sur la façon dont

ces deux mécanismes sont mélangés *in vivo*. Il serait par exemple intéressant d'introduire une forme de branchement dans le système pour tester l'influence d'un nombre de filaments variant au cours du temps sur la génération de force. On pourrait aussi envisager d'étudier comment la génération de force évolue lorsque la dynamique d'élongation des filaments est modifiée par des protéines telles que des formines.

Les billes magnétiques comme capteurs de force : application à la pression de croissance de filaments d'actine.

Les colloïdes superparamagnétiques sont utilisés dans de nombreuses études pour appliquer une force sur des cellules ou des molécules d'ADN. Dans une première partie, nous explorons le processus physique par lequel ces objets acquièrent une aimantation leur permettant d'exercer des forces. Nous montrons comment la présence de quelques gros grains ferromagnétiques dans les colloïdes leur permet de s'orienter dans un champ externe. La robustesse de ce modèle est démontrée par sa généralisation à plusieurs tailles de colloïdes et sa cohérence avec les propriétés du ferrofluide ayant servi à les fabriquer. Dans une seconde partie, la réaction de filaments d'actine à la pression exercée par des colloïdes superparamagnétiques est étudiée. Nous sondons ainsi le mécanisme par lequel la polymérisation d'actine peut générer les forces à l'origine du phénomène de motilité cellulaire. La maîtrise de l'organisation des filaments autorise à étudier deux situations idéales. Dans l'une les filaments sont très fluctuants, et nous montrons que leur longueur est indépendante de la force appliquée. Ceci n'est plus vrai dans la deuxième situation, où les filaments rigides poussent face à la charge. Nous mesurons ainsi pour la première fois l'effet d'une force sur la vitesse de polymérisation de l'actine. Un modèle numérique de type Brownian ratchet sans partage de la charge permet de décrire la force générée.

Magnetic beads as force sensors : application to actin filaments growth pressure.

Superparamagnetic colloids are used in many studies to apply a force or a torque on biological systems such as cells or DNA molecules. The physical process by which magnetization appears in those beads, allowing them to exert forces, is still poorly understood. In a first part, with an original experimental setup based on optical anisotropy measurements, we show that the apparently magnetically isotropic beads can orient themselves in a magnetic field. Equilibrium and out of equilibrium measurements allowed to develop a model explaining how a few big grains in the beads are responsible for the whole coupling. The robustness of this model lies in its generalization to several sizes of beads and its consistency with the properties of the ferrofluid used to make them. In a second part, the reaction of a few actin filaments to the pressure applied by superparamagnetic colloids is studied. This setup represents a direct way to probe the physical mechanism underlying the production of force by actin filaments polymerization in cellular motility. Controlling the filaments' organization allows to study two ideal ideal situations. We experimentally show that in the former situation the polymerization velocity is independent of the applied force. This is no longer true in the latter situation where the filaments are very stiff. Thus, we experimentally show for the first time the effect of force on actin filaments polymerization. A *Brownian ratchet* based numerical model with no load sharing can describe the production of force in that case.