



HAL
open science

Force générée par la polymérisation de filaments d'actine

Coraline Brangbour

► **To cite this version:**

Coraline Brangbour. Force générée par la polymérisation de filaments d'actine. Chimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : . pastel-00005102

HAL Id: pastel-00005102

<https://pastel.hal.science/pastel-00005102>

Submitted on 22 May 2009

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 PARIS VI

École Doctorale de Chimie Physique et Analytique de Paris Centre

Spécialité : Matière Condensée – Chimie et Organisation

présentée par

Coraline BRANGBOUR

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse :

Force générée par la polymérisation de filaments d'actine

Soutenue publiquement le 28 novembre 2008 devant le jury composé de :

M.	Jean-François JOANNY	Président du jury
M.	Laurent BLANCHOIN	Rapporteur
M.	Frank JÜLICHER	Rapporteur
Mme	Marie-France CARLIER	Examinatrice
M.	Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M.	Jean BAUDRY	Encadrant



Remerciements

Je me souviens très exactement de cet après-midi où je suis venue visiter le laboratoire des Colloïdes et Matériaux Divisés et durant laquelle avec Jean, nous avons eu nos premiers échanges sur notre « chère » actine. Un peu plus de trois années se sont écoulées et le moment est venu pour moi d'adresser mes remerciements.

Mes premiers remerciements vont évidemment à Jérôme Bibette et à Jean Baudry. Jérôme, je le remercie pour l'autonomie qu'il m'a accordée et pour l'analyse pertinente qui a dynamisé ce travail à des moments déterminants de ma thèse. Jean, pour m'avoir témoigné sa confiance, pour sa disponibilité de chaque jour et pour son immense culture scientifique qu'il a partagée avec moi. Sa passion pour la recherche, son esprit d'analyse et sa capacité à trouver des solutions sont les qualités qui m'ont guidée au cours de ma thèse. Merci pour tout ce qu'il m'a enseigné et qui me sera très utile dans ma future vie professionnelle. Je lui adresse mes plus sincères remerciements et lui témoigne toute mon amitié.

J'adresse ensuite mes plus vifs remerciements aux membres de mon jury : Jean-François Joanny pour m'avoir fait l'honneur de le présider, Laurent Blanchoin et Frank Jülicher pour avoir accepté de rapporter ce travail et Marie-France Carlier pour m'avoir fait le

privilège de prendre part à ce jury.

Cette thèse est le résultat d'une collaboration entre différents groupes de biologistes, de physiciens et de physico-chimistes que je voudrais remercier ici ; sans eux ce travail n'aurait pu aboutir, ni même débiter.

Rien n'aurait été possible sans le Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurale - Dynamique du cytosquelette puisque toutes mes connaissances en biochimie de l'actine, je les dois à plusieurs membres de cette équipe. Je remercie tout d'abord Marie-France Carlier. Ce fut pour moi un honneur de bénéficier tout au long de ma thèse de l'expertise et du savoir précieux que Marie-France a mis à ma disposition, toujours avec beaucoup d'enthousiasme et malgré son emploi du temps très chargé. Emmanuèle Helfer, merci pour l'accueil chaleureux qu'elle m'a toujours réservé, le temps qu'elle m'a toujours accordé lors de mes visites, et toutes les astuces de protocoles sur la polymérisation de l'actine et les gels de polyacrylamide. Merci aussi à Dominique Didry pour le travail exceptionnel qu'elle réalise. Et puis merci à l'ensemble de l'équipe et plus particulièrement à Beata Bugyi, Guillaume Romet-Lemonne, Mark Bathe, Stéphane Roméro et Vincent Delatour.

Ensuite, je remercie tout particulièrement Olivia du Roure et Marc Fermigier du laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes qui ont collaboré activement à ce travail depuis mon stage de DEA avec nos fameuses expéditions à Gif ! Marc, sa rigueur et son exigence scientifique ont été un vrai enseignement. Olivia, son esprit critique et la pertinence de ses remarques au cours de nos discussions ont toujours été très enrichissants, merci pour son soutien et ses encouragements dans les moments de doute, et puis pour m'avoir appris que la recherche pouvait se faire dans la détente et la bonne humeur !

Un grand merci à David Lacoste du Laboratoire de Physico-Chimie Théorique pour les discussions passionnantes que nous avons eues à la fois sur l'actine mais aussi sur les fluctuations thermiques.

Et puis merci aussi à Rémi Dreyfus pour l'ensemble de son travail sur la machine de force.

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire des Colloïdes et Matériaux Divisés de l'École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles faisant partie de l'unité de recherche 7612 dirigée par Valérie Cabuil. Je la remercie de m'y avoir accueillie.

Trois ans de thèse c'est aussi beaucoup de rencontres et de discussions ... Alors merci à David Pine, Jacques Prost et Paul Chaikin pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie également Jack-Christophe Cossec pour m'avoir initiée au Western Blot. Merci aussi à Nicolas Royer et Anne Simon pour le matériel SDS-Page qu'ils m'ont prêté.

Merci aux stagiaires qui ont « mis les mains dans le cambouis » : Blandine Durand, Benjamin Marty et Marta de Toni.

C'est aussi une vraie petite famille que je quitte, alors merci à : Djamel pour son soutien, son aide toujours spontanée et sincère, mais aussi son mauvais caractère attachant ☺ ; Enric, pour nos discussions tennistiques, « bonbonistiques » et scientifiques (au fait, y'a de la dépolymérisation dans cette fancy manip ?) ; Geneviève, pour sa sympathie de tous les jours ; Jean-Yves, pour son aide permanente et son sens du partage ; Lise, pour sa disponibilité et tout le travail qu'elle réalise pour le laboratoire ; Matthijs, it's a real pleasure to know you, thanks for our nice english and french « discussions » ; Nicolas, pour ses conseils avisés en MatLab et nos parties de tennis dans le vent, le froid et au Lux' ! ; et puis merci à Damien, Fabien, Laurent et Rachid.

Àmes cop's de couloirs et de paillasses ... Julie et Audrey. Mes journées de manips n'auraient pas été aussi agréables sans nos discussions de blonde ! Merci pour votre

soutien et votre bonne humeur de tous les jours ! À tes futures blagues dJoulaï et Audrey, à nos futurs Bo Bun Chà Giò ensemble !

Trois ans de thèse c'est aussi trois ans de collocation. Isabelle, déjà plus de trois ans que nous partageons le bureau E1.05. De nos moments de détente à nos problèmes d'odeurs chimiques, ce fut un vrai plaisir de partager ce bureau et j'en garderai un très bon souvenir. Voisine de bureau mais aussi voisine de paillasse . . . J'en profite pour souligner son travail au sein du laboratoire et notamment l'étalonnage éprouvant des micropipettes. Et puis Jay-D, dernier arrivé dans ce bureau, je lui souhaite encore moult voyages à travers le monde.

Comment ne pas remercier les « anciens du labo » qui m'ont chaleureusement accueillie ainsi que toutes les autres personnes que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de ces trois années : Abdes El-Harrak, Emmanuel Bertrand, Jacques Fattaccioli (merci pour la page de garde Jak !), Jérémie Gummel, Julie Guéry, Julien Heuvingh, Julien Sylvestre, Laetitia Cohen-Tanoudji, Matthieu Goutayer, Rémi Dreyfus et Sébastien Abramson.

Un grand merci à mes « relecteurs personnels » : mon père pour avoir fait preuve d'autant de concentration pour des choses auxquelles il n'était pas forcément sensible, Matthieu pour ses remarques et sa rigueur typographique, Mathilde alias $\overline{Ma} \sim$ pour ses corrections et ses critiques, mais aussi pour son soutien et son amitié qui ont beaucoup compté dans les derniers mois.

Merci à tous mes amis pour tous les bons moments passés ensemble : Anne Gwenn, Ben, Céline, Célinouille, David, Emilie, Filip, Hélène, Henri, Majdi, Mathilde, Max, Nico, Pierre, Satchin, Sébastien K, Sébastien L, Sophie, Steeve et Vincent.

Je remercie avec beaucoup d'affection mes parents, mon frère et mes grand-parents pour leur soutien et leurs encouragements.

Pour finir, je remercie Matthieu pour m'avoir soutenue pendant ces trois ans et « supportée » pendant ces trois derniers mois, pour nos discussions scientifiques et son génie informatique, merci pour tout ce qu'il m'apporte chaque jour.

Table des matières

1	Introduction générale	15
I	De la biochimie de l'actine à la force générée par sa polymérisation	19
2	La biochimie de l'actine	23
2.1	Généralités	23
2.2	Polarité du filament et concentration critique	24
2.3	Hydrolyse de l'ATP	26
2.4	Le <i>treadmilling</i> ou tapis roulant	27
2.5	Les protéines régulatrices	28
2.5.1	Les ABP de l'actine-G	29
2.5.2	Les protéines nucléatrices	29
2.5.3	Les protéines de coiffe	31
2.5.4	Les protéines de dépolymérisation	31
2.5.5	Les protéines réticulantes	31

3	Forces mécaniques dans les systèmes biologiques	33
3.1	La motilité cellulaire	33
3.2	La <i>listeria monocytogenes</i> et autres pathogènes	36
3.3	<i>Sereocilia</i> et la réaction acrosomienne	38
4	La polymérisation comme moteur	41
4.1	Propriétés mécaniques et élastiques des filaments d'actine	41
4.1.1	Étude d'un filament	41
4.1.1.1	Fluctuations thermiques et courbure d'un filament	41
4.1.1.2	La force de flambement ou force de buckling	44
4.1.2	Étude d'un gel d'actine	45
4.1.2.1	Mesures rhéologiques	45
4.1.2.2	Mesures élastiques sur des systèmes biomimétiques	47
4.2	Profil force-vitesse	48
4.2.1	Modèles théoriques	48
4.2.1.1	Approche thermodynamique : cas d'un filament	48
4.2.1.2	Le modèle du Brownian Ratchet	50
4.2.2	Mesures expérimentales à l'échelle de quelques filaments	53
4.2.2.1	Estimation de la <i>stalling</i> force	53
4.2.2.2	Profil force-vitesse d'un microtubule	53
4.2.2.3	<i>Stalling force</i> de quelques filaments d'actine	54
4.2.3	Mesures expérimentales sur des systèmes macroscopiques	55
4.2.3.1	Profil force-vitesse de gels d'actine	55
II	Des colloïdes magnétiques à la mesure de force	61
5	Les particules superparamagnétiques	65

5.1	Introduction	65
5.2	Fabrication	67
5.3	Calcul de la force magnétique	68
5.3.1	Modèle de Zhang et Widom	68
5.3.2	La susceptibilité magnétique	70
6	Mesure des forces colloïdales	73
6.1	Techniques de mesure de forces	73
6.2	La machine de force magnétique	74
6.2.1	Principe de la technique	75
6.3	La machine de force par imagerie optique	77
6.3.1	Passage à la mesure par vidéomicroscopie	78
6.3.2	Dispositif expérimental	79
6.3.3	Principe de la mesure force-distance	81
6.3.3.1	Analyse des images	81
6.3.3.2	Longueurs des chaînes	83
6.3.3.3	Automatisation de la mesure	83
6.3.4	Stabilité colloïdale	84
6.3.5	Résolution de la mesure	85
6.3.6	Profils électrostatiques	87
6.3.7	Fluctuation thermique : dilatation thermique d'une chaîne à 1D	88
6.3.8	Valeur absolue de la force	92
III	Application aux filaments d'actine	97
7	Description du système pour la mesure de force	101
7.1	La gelsoline comme protéine nucléatrice	101

7.1.1	Fonctionnalisation des particules magnétiques	101
7.1.2	Optimisation du système	103
7.2	Mesure des forces associées à la polymérisation	104
8	Force générée par la polymérisation de l'actine et propriétés mécaniques des filaments	107
8.1	Résultats cinétiques	107
8.1.1	Courbes distance-temps	107
8.1.2	Profil force-vitesse	110
8.2	Propriétés mécaniques et élastiques des filaments recrutés	112
8.2.1	Réponse mécanique du système	112
8.2.2	Géométrie du système	114
8.2.2.1	Distance moyenne entre filament	114
8.2.2.2	Nombre de filaments dans le contact	115
8.2.3	Énergie élastique du système	117
8.2.4	Effet entropique	119
8.3	Force associée à la polymérisation : nombre de filaments actifs	121
8.4	De la force entropique à la loi de vitesse	124
9	Conclusion et perspectives	131
IV	Annexes	133
A	Conditions biochimiques et physico-chimiques	135
A.1	Concentration critique	135
A.2	Constante d'association k_{on}	136
A.3	Rappels des conditions expérimentales et des constantes cinétiques	138

B	Fonctionnalisation et caractérisation des particules magnétiques	139
B.1	Fonctionnalisation des particules	139
B.1.1	Biotinylation de la gelsoline	139
B.1.2	Greffage des particules	141
B.1.3	Caractérisation des particules par spectrométrie de fluorescence . .	141

CHAPITRE 1

Introduction générale

Plusieurs mécanismes biologiques comme la migration cellulaire utilisent la polymérisation des filaments d'actine comme moteur mécanique. Au cours de la polymérisation, l'énergie chimique libérée à l'addition d'un monomère d'actine dans le filament, est convertie en travail mécanique et une force est générée. Les filaments ainsi formés s'organisent grâce à des protéines liant l'actine et s'assemblent pour former des structures qui diffèrent par leurs propriétés mécaniques et élastiques mais aussi de leurs fonctions dans les différents processus biologiques.

Pour établir le lien entre les propriétés mécaniques et la force générée par une population de quelques filaments d'actine, l'idée la plus simple est d'appliquer une force connue opposée à la polymérisation. Cette contrainte permet de sonder à la fois la réponse mécanique des filaments, mais aussi de comprendre quels sont les mécanismes à l'origine de la production de la force. L'étude d'un système à N filaments est compliquée et pose la question de savoir comment la contrainte est répartie sur l'ensemble de la population.

Expérimentalement, les principaux problèmes pour sonder de tels processus résident dans la difficulté de manipuler ces filaments nanométriques, d'en connaître leur nombre et leur organisation, et de pouvoir appliquer une force connue et du même ordre de grandeur que la force générée dans les systèmes biologiques.

La méthode que nous avons développée utilise des colloïdes magnétiques comme support pour manipuler les filaments d'actine. Pour cela, la polymérisation des filaments est directement initiée sur la surface des particules. En présence d'un champ magnétique, ces dernières s'organisent en chaîne par des interactions dipôle-dipôle, et une force magnétique compressive de l'ordre de plusieurs dizaines de pN est induite sur les filaments qui polymérisent. Les particules s'écartent au cours du temps et en fonction de la force appliquée, la vitesse d'écartement des particules est ralentie.

En suivant l'évolution de la distance entre particules, nous détaillons la relation force-vitesse et les mécanismes à l'origine de la production de la force. La réponse mécanique du nombre de filaments sous contrainte est aussi abordée. Enfin, en modifiant le nombre de filaments recrutés, nous discutons aussi des effets collectifs dans la production de la force.

Dans une première partie "*De la biochimie de l'actine à la force générée par sa polymérisation*", nous détaillons le rôle de l'actine dans les principaux systèmes biologiques en rappelant ses caractéristiques biochimiques essentielles. Nous développons aussi l'ensemble des résultats théoriques et expérimentaux les plus importants connus jusqu'à ce jour.

Dans une seconde partie "*Des colloïdes magnétiques à la mesure de force*", nous présentons la méthode de la machine de force développée pour la mesure de force ainsi que les propriétés des particules magnétiques.

Dans une troisième partie "*Application aux filaments d'actine*", nous exposons nos résultats sur la force générée par la polymérisation de l'actine. Nous discutons les profils force-

vitesse obtenus ainsi que les propriétés mécaniques et les effets collectifs d'une population de quelques filaments d'actine.

Et dans une dernière partie "*Annexes*", nous résumons les conditions biochimiques et physico-chimiques de notre système ainsi que les détails sur la fonctionnalisation et la caractérisation des particules magnétiques.

Première partie

De la biochimie de l'actine à la force générée par sa polymérisation

Introduction

L'actine sous forme de monomère polymérise en filaments semi-flexibles. Dans cette simple conformation, le système n'est pas le plus efficace en terme de vitesse de polymérisation et de résistance mécanique. Il existe une multitude de protéines qui s'associent à l'actine et qui contribuent à la structure dynamique de son réseau. Ces protéines sont impliquées dans des fonctions aussi diverses que la formation de câbles, l'ancrage des filaments à la membrane plasmique ou la régulation de son taux de polymérisation et de dépolymérisation. L'organisation ainsi contrôlée, confère à ce réseau des propriétés mécaniques et élastiques remarquables dans de nombreux processus biologiques.

C'est au cours de la polymérisation de l'actine en filament que l'énergie chimique est libérée à l'addition d'une sous-unité, générant ainsi une force mécanique sur l'obstacle contre lequel il est confiné. En appliquant une contrainte opposée à la polymérisation des filaments, on peut caractériser les mécanismes à l'origine de la production de la force.

Il existe peu de résultats expérimentaux faisant le lien entre les propriétés mécaniques des filaments et les mécanismes de production de la force. Les expériences sont techniquement difficiles à réaliser.

Cette partie détaille les caractéristiques biochimiques principales de l'actine et comment les protéines régulatrices contrôlent son organisation. Ensuite, nous présentons plusieurs mécanismes biologiques dans lesquels les propriétés de l'actine s'illustrent. Puis, dans un dernier chapitre, nous résumons l'ensemble des résultats théoriques et expérimentaux les plus importants.

CHAPITRE 2

La biochimie de l'actine

2.1 Généralités

L'actine est une protéine constituée d'une chaîne polypeptidique de 375 acides aminés et possède un poids moléculaire de 42 kDa. Elle a été découverte par Straub en 1942 dans les fibres musculaires puis, elle a été identifiée dans les années 60 comme étant l'une des protéines les plus abondantes du cytosquelette des cellules eucaryotes.

L'actine existe sous forme globulaire à l'état de monomère et est appelée actine-G. Ces monomères polymérisent sous forme de filaments appelés actine-F (FIG 2.1).

L'analyse de la structure cristalline de l'actine aux rayons X montre la présence de deux lobes divisés en deux sous-domaines (Kabsch *et al.*, 1990). La jonction entre ces quatre sous-domaines forme une crevasse dans laquelle réside un cation divalent calcium ou magnésium et un nucléotide ATP ou ADP. Ce complexe, lié par des liaisons ioniques au monomère, est indispensable à sa stabilité et permet d'éviter toute dénaturation (Valentin-Ranc et Car-

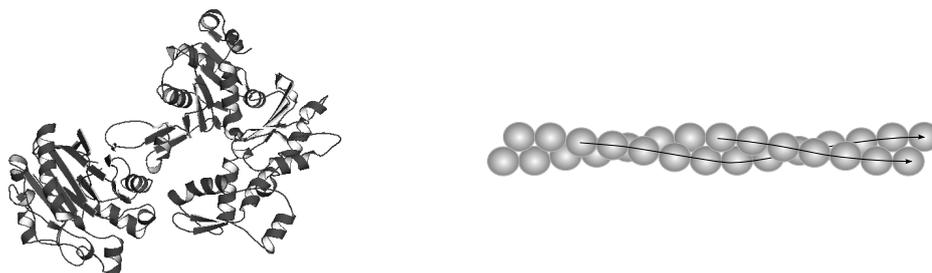


FIG. 2.1 – Structure d'un monomère d'actine par cristallographie aux rayons X (Kabsch *et al.* (1990), Protein Data Bank : 1ATN) et représentation de la structure hélicoïdale d'un filament d'actine.

lier, 1991). La polymérisation des monomères conduit à la formation d'un filament d'actine hélicoïdal par enroulement de deux filaments (Moore *et al.*, 1970).

2.2 Polarité du filament et concentration critique

Chaque monomère d'actine possède une structure asymétrique et l'empilement successif des sous-unités conduit à la formation d'un filament polaire avec des extrémités structurellement différentes. Cette asymétrie engendre une différence des constantes cinétiques entre les deux extrémités et on distingue l'extrémité « **barbée** » qui polymérise plus rapidement que l'extrémité « **pointue** » (Pollard et Mooseker, 1981; Pollard, 1986).

Cette différence cinétique entre les deux extrémités est schématisée sur le graphique 1 de la figure 2.2 qui représente l'évolution du taux de polymérisation en fonction de la concentration en actine pour le bout barbé (—) et le bout pointu (- - -).

À l'état stationnaire, une faible quantité de monomère reste en solution et contribue à l'équilibre thermodynamique du système. Les deux droites se croisent à cette concentration appelée concentration critique et respecte le ratio des constantes de dissociation k_{off} et d'association k_{on} aux extrémités barbées et pointues tel que

$$[C_c] = \frac{k_{off-b}}{k_{on-b}} = \frac{k_{off-p}}{k_{on-p}} \quad (2.1)$$

2.2. POLARITÉ DU FILAMENT ET CONCENTRATION CRITIQUE

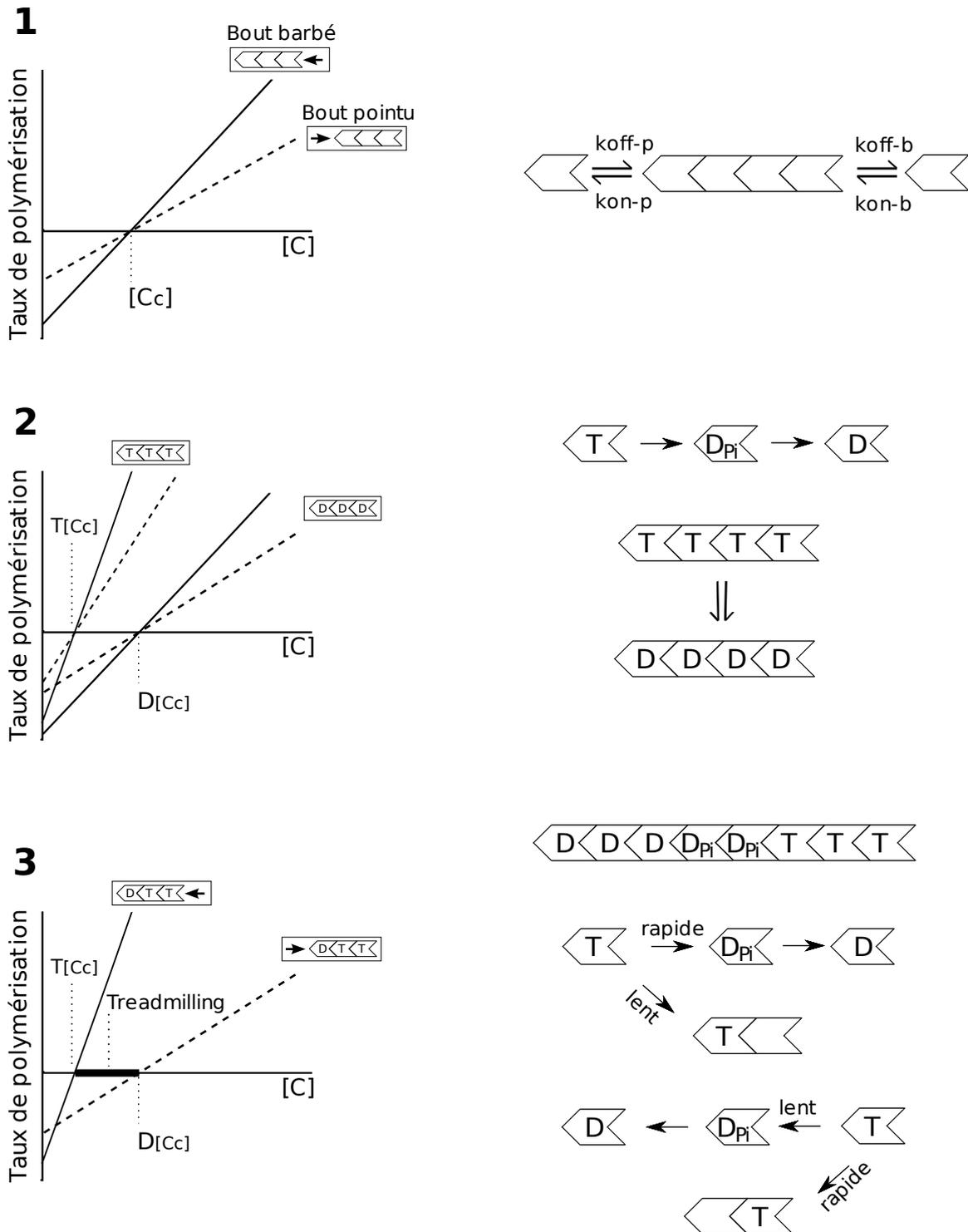


FIG. 2.2 – Considérations cinétiques de la polymérisation et dépolymérisation de l'actine (Theriot, 2000) : 1- Polarité du filament. 2- Hydrolyse de l'ATP. 3 - Conséquences de la polarité du filament et de l'hydrolyse du nucléotide sur l'insertion d'un monomère dans le filament. **À gauche** : Taux de polymérisation en fonction de la concentration en monomère. **À droite** : Représentations schématiques du filament dans les cas 1, 2 et 3.

2.3 Hydrolyse de l'ATP

Une fois le monomère incorporé dans le filament, le nucléotide ATP s'hydrolyse entraînant la formation du complexe ADP-Pi, puis après dissociation du phosphate inerte Pi conduit à la forme ADP. Ainsi, les sous-unités d'actine à l'intérieur d'un filament évoluent toutes d'un état ATP vers un état ADP comme le montre le schéma 2 de la figure 2.2. Bien que la vitesse d'hydrolyse de l'ATP et de dissociation du phosphate soient connus (TAB 2.1), le mécanisme par lequel se fait l'hydrolyse est à l'heure actuelle débattu. Deux modèles sont proposés. Le premier modèle propose une hydrolyse aléatoire du nucléotide et indépendante de la forme ATP ou ADP des sous-unités voisines (Pollard et Weeds, 1984). À l'inverse, le second modèle est dit vectoriel (Carlier *et al.*, 1987) et l'hydrolyse a lieu à l'interface des parties ATP et ADP.

Considérons un filament sous une forme T. Après hydrolyse de toutes les sous-unités, le filament se trouve sous une forme D. L'énergie dissipée au moment de la dissociation de chaque phosphate inerte rend la forme D du filament moins stable que sous sa forme initiale T. Par conséquent, la concentration critique pour le filament D est plus grande que pour le filament T tel que $C_c^T < C_c^D$. Les formes D et T dépolymérisent respectivement pour des concentrations en actine inférieures aux concentrations critiques C_c^D et C_c^T comme le montre le schéma 2 de la figure 2.2.

$k_{ATP\ hydro}$	$0,35\ s^{-1}$
$k_{Pi\ diss}$	$0,0019\ s^{-1}$

TAB. 2.1 — Constante d'hydrolyse de l'ATP et constante de dissociation du phosphate inerte (Blanchoin et Pollard, 2002; Carlier et Pantaloni, 1986).

2.4 Le *treadmilling* ou tapis roulant

La polarité du filament entraîne des différences cinétiques et on différencie les constantes d'association et de dissociation différentes à l'extrémité barbée et à l'extrémité pointue. L'hydrolyse de l'ATP oblige à considérer le filaments sous deux états différents : une forme T et D qui se distingue par leur concentration critique différente. Comparons à présent la vitesse d'insertion des monomères à la vitesse d'hydrolyse de l'ATP aux deux extrémités.

Au bout pointu, la constante d'association k_{on-p} est faible devant l'hydrolyse du nucléotide et au moment de l'ajout du monomère, l'extrémité se trouve déjà sous la forme D. À l'extrémité barbée au contraire, l'addition des sous-unités est plus rapide que l'hydrolyse de l'ATP et le filament se trouve encore sous la forme T (Schéma 3 de la figure 2.2). Le filament est donc disymétrique avec une extrémité T au bout barbé et une extrémité D au bout pointu. Suivant les concentrations en actine, les constantes d'association à considérer sont donc $k_{on/off-p}^D$ et $k_{on/off-b}^T$.

Pour des concentrations en actine telles que $C_c^T < C < C_c^D$, autant d'unités peuvent s'ajouter à l'extrémité barbée que d'autres sont perdues à l'extrémité pointue et la longueur du filament est constante. Ce processus appelé **treadmilling** (Wegner, 1976) est une conséquence directe de la polarité du filament et de l'hydrolyse du nucléotide. La concentration critique pour un tel système s'exprime par

$$[C_c] = \frac{k_{off-p}^D}{k_{on-b}^T} \quad (2.2)$$

puisque seuls les phénomènes de dépolymérisation à l'extrémité pointue et polymérisation à l'extrémité barbée sont à considérer.

Ce phénomène a été observé en tête des kératocytes (Theriot et Mitchison, 1991) et des fibroblastes (Wang, 1985), ainsi qu'à l'arrière de la bactérie *Listeria monocytogenes* (Theriot *et al.*, 1992). In vitro, le *treadmilling* apparaît à des concentrations en actine égales à 0,13

Constante	Bout barbé		Bout pointu	
	Act-G (ATP)	Act-G (ADP)	Act-G (ATP)	Act-G (ADP)
k_{ON}	11,6	3,8	1,3	0,16
k_{OFF}	1,4	7,2	0,8	0,27
C_C	0,12	1,9	0,6	1,7

TAB. 2.2 – Constantes d'association k_{ON} ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$), de dissociation k_{OFF} (s^{-1}) et concentration critique (μM) pour les deux extrémités (Howard, 2001).

μM et les vitesses mesurées sont de l'ordre de 0,1 monomère par seconde (Wegner, 1976). Ces valeurs restent entre 10 et 100 fois inférieures au *treadmilling* observé dans la cellule. D'autres protéines telles que le complexe Arp2/3, les protéines de coiffe CP ou la profiline modifient les taux de polymérisation et de dépolymérisation. L'ADF augmente de deux ordres de grandeurs le taux de dépolymérisation (Loisel *et al.*, 1999; Pollard *et al.*, 2000) et permet d'avoir un réservoir d'actine concentré pour la polymérisation.

Les valeurs des constantes cinétiques pour les deux extrémités sont détaillées dans le tableau 2.2 pour les bouts barbé et pointu.

2.5 Les protéines régulatrices

Les protéines régulatrices de l'actine ou *Actin Binding Proteins* (ABP) se couplent à l'actine aussi bien sous sa forme F que sous sa forme G. Ces protéines sont impliquées dans des fonctions aussi diverses que la consolidation des filaments, la régulation du taux de polymérisation, la formation de faisceaux de filaments ou encore l'ancrage des filaments à la membrane plasmique. Aujourd'hui plus d'une centaine d'ABP sont connues et une recherche active permet d'en découvrir de nouvelles comme **Spire** et **Cordon-bleu**. On ne présente ici que les principales découvertes à ce jour et qui un ont été reconnues pour avoir un rôle primordial dans la régulation du cytosquelette :

- les ABP de l'actine-G,
- les protéines nucléaires,

- les protéines de coiffe,
- les protéines de dépolymérisation,
- les protéines réticulantes.

2.5.1 Les ABP de l'actine-G

Dans la cellule, la concentration cellulaire d'actine est comprise entre 50 et 100 μM . À ces concentrations, l'actine doit normalement polymériser. En réalité, elle est « séquestrée » par des protéines comme la **thymosine- β 4** qui, liée au monomère, inhibe la formation de filaments. La **profiline**, autre protéine de l'actine-G, complexe préférentiellement l'actine ATP et l'assemblage actine-profiline s'incorpore aux filaments à l'extrémité barbée. Paradoxalement, cette protéine entraîne deux processus opposés dans la régulation de l'actine. D'une part, elle abaisse la concentration critique entraînant une augmentation de la polymérisation à l'extrémité barbée ; d'autre part, ses fonctions séquestrantes maintiennent les monomères libres lorsque les extrémités barbées sont *cappées*, c'est à dire bloquées. Une fois le monomère inséré dans le filament, la profiline se détache selon un mécanisme fortement discuté. Son détachement pourrait être provoqué par l'hydrolyse du nucléotide (Pantaloni et Carlier, 1993) ; à l'inverse, elle pourrait se décrocher suite à un changement conformationnel de l'actine sans aucune corrélation avec l'hydrolyse de l'ATP (Blanchoin et Pollard, 2002).

2.5.2 Les protéines nucléatrices

Une nouvelle extrémité barbée conduisant à la formation d'un nouveau filament ne peut s'effectuer de manière spontanée puisque l'ensemble du réservoir monomérique est séquestré. La formation d'un nouveau filament peut être obtenu soit par dégagement d'un extrémité cappée par perte de la protéine de coiffe, soit par fragmentation d'un filament déjà existant ou bien par la nucléation d'un nouveau filament grâce aux protéines nucléatrices.

Le complexe **Arp2/3** multiplie les filaments par branchement. Il interagit avec le bout barbé d'un filament préexistant et le bout pointu d'un autre filament avec un angle de 70°. La manière dont le complexe nucléé les nouveaux filaments à partir d'un filament mère n'est pas complètement établi à ce jour et plusieurs hypothèses ont été avancées : la nucléation dendritique (Pollard et Borisy, 2003) et le branchement autocatalytique (Pantaloni *et al.*, 2000).

Les **formines** n'ont été découvertes que récemment et interviennent dans différents mécanismes tels que la formation d'un anneau contractile qui sépare les cellules filles durant la cytokinèse (Lee *et al.*, 1999), et plus particulièrement la formation des filopodes (Peng *et al.*, 2003). Les formines sont composées de deux domaines FH1 et FH2. Le domaine FH2 est suffisant pour nucléer l'actine en interagissant avec l'extrémité barbée (Pruyne *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002). Ce domaine possède des propriétés très spécifiques puisqu'il ne bloque pas la polymérisation à l'extrémité barbée mais coiffe le filament le plus long de la double hélice alors que l'autre reste libre pour accueillir une protéine. L'insertion des sous-unités se fait selon un mécanisme processif. Le domaine FH2 seul ne permet pas la polymérisation du complexe actine-profiline mais nécessite la présence du domaine FH1 (Sagot *et al.*, 2002) et le taux de polymérisation dans ces conditions est largement supérieur à un filament normal (Kovar *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2004). Le rôle de la profiline dans les mécanismes processifs des formines n'est toujours pas clairement identifié, en particulier son implication potentielle dans l'hydrolyse de l'ATP (Romero *et al.*, 2004; Dickinson et Purich, 2002; Kovar *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007).

Deux nouvelles protéines nucléatrices de l'actine ont été découvertes récemment : **spire** (Quinlan *et al.*, 2005) et **cordons-bleus** (Ahuja *et al.*, 2007). La première contient quatre domaines WH2 successifs capables d'associer quatre monomères, amorce d'un filament ; alors que pour la seconde, trois domaines WH2 permettraient la formation d'un trimère (Winckler

et Schafer, 2007; Renault *et al.*, 2008).

2.5.3 Les protéines de coiffe

D'autres protéines dont la fonction est de *capper* l'extrémité barbée, sont capables de réguler la dépolymérisation de l'actine du côté pointu et d'augmenter ainsi le réservoir de monomère. En effet, un filament à l'état stationnaire bloqué au bout barbé ne peut que se raccourcir par dépolymérisation du bout pointu. Par conséquent, on observe un ralentissement global du *treadmilling* des filaments. La dépolymérisation accélérée permet d'augmenter très rapidement le réservoir de monomères disponibles pour d'autres processus. Il existe trois grandes familles de protéines coiffantes : la famille des **capping proteins** (CP), les **gelsolines** et les **villines**. Les deux dernières apportent une spécificité supplémentaire comparée aux CP puisqu'elles peuvent se lier latéralement à un filament pour le fragmenter en emportant avec elles l'extrémité pointue.

2.5.4 Les protéines de dépolymérisation

Les *actin binding proteins* de la famille des **ADF/cofiline** sont capables d'affecter la polymérisation du bout pointu. Elles se lient aussi bien à l'actine-G qu'à l'actine-F mais préférentiellement à la forme ADP du bout pointu (section 2.3). À cette extrémité, les filaments couverts d'ADF/cofiline sont déstabilisés ce qui induit une augmentation de la dépolymérisation (Carlier *et al.*, 1997) et une accélération du *treadmilling*.

2.5.5 Les protéines réticulantes

Hormis le complexe Arp2/3, d'autres protéines contribuent à organiser les filaments pour les structurer sous forme d'un réseau ou de câbles : le **fascin** forme des fibres de stress et intervient dans la formation des filopodes ; le **scruine** organise environ une population de 80 filaments d'actine en câble et intervient dans le processus acrosomien décrit au chapitre 3.3.

Forces mécaniques dans les systèmes biologiques

3.1 La motilité cellulaire

De nombreuses cellules possèdent la faculté de se mouvoir grâce à la polymérisation de l'actine. La motilité cellulaire intervient dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques : la cicatrisation au cours de laquelle les fibroblastes migrent pour restaurer un tissu endommagé, l'infection où les macrophages se déplacent vers le site infecté pour détruire les agents pathogènes, la métastatisation des cancers où les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire pour se disséminer à travers l'organisme via le réseau sanguin.

Le processus de migration cellulaire peut être décrit en trois étapes principales illustrées sur la figure 3.1. Premièrement, la tête de la cellule s'étend et se propulse vers l'avant grâce à la polymérisation de l'actine. Cette protrusion cellulaire adhère ensuite au substrat en créant de nouveaux points focaux par le biais d'intégrines. Ces points d'ancrage servent de points d'appui à la cellule et peuvent être le départ de fibres de stress. Ces fibres sont des faisceaux

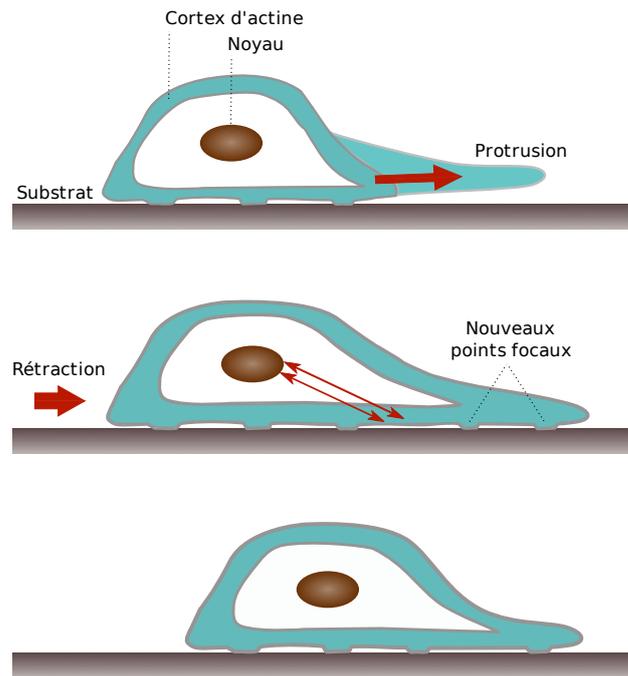


FIG. 3.1 – Cycle migratoire d'une cellule en trois étapes distinctes.

de filaments d'actine qui interagissent avec des moteurs moléculaires de myosine. L'interaction actine-myosine engendre la contraction de la fibre de stress et permet, à la cellule, dans une dernière étape, de se contracter tout en détachant ces points d'adhésion arrière et ramener ainsi tout le corps cellulaire vers l'avant.

La protrusion cellulaire peut prendre différentes formes, chacune d'entre elles possédant des fonctionnalités différentes. Le **lamellipode** est une large protrusion branchée formée à l'avant des cellules. L'épaisseur de cette structure est comprise entre 100 et 200 nm et on y trouve environ $1200 \text{ filaments}/\mu\text{m}^{-2}$ (Abraham *et al.*, 1999; Schaub *et al.*, 2007). La polymérisation des filaments s'effectue à la surface interne de la membrane aux extrémités barbées des filaments par activation du complexe Arp2/3, présent en concentration importante sur une large bande de $1,5 \mu\text{m}$. À l'arrière du front branché, les extrémités pointues dépolymérisent et la structure adopte un *treadmilling* d'ensemble (Pollard et Borisy, 2003). Le **filopode** est une structure beaucoup plus petite formée de filaments d'actine organisés

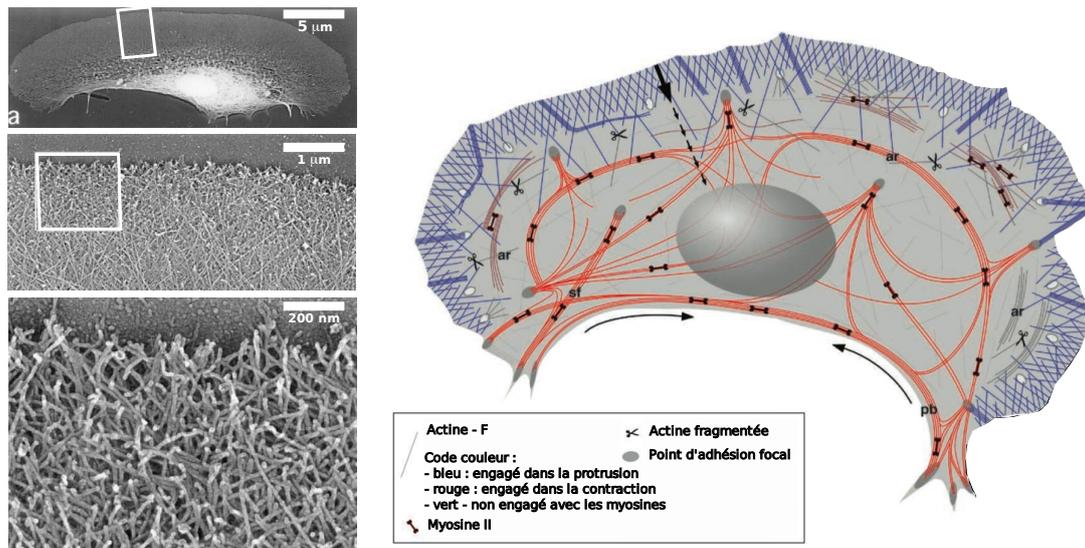


FIG. 3.2 – À gauche. Images par microscopie électronique d'un kératocyte de poisson. Extrait de Svitkina *et al.* (1997). À droite. Schéma du cytosquelette d'actine d'un mélanome (Small et Resch, 2005) : structures mécaniques essentielles à la motilité cellulaire et leurs emplacements dans la cellule.

en faisceaux formant des câbles stabilisés par la fascine. Ces structures prennent naissance en périphérie du lamellipode à partir des structures branchées. Les filopodes sont impliqués dans divers processus comme l'exploration de l'environnement local ou encore de l'adhésion au substrat.

Comme nous venons de l'évoquer, les cellules sont des entités capables de se déplacer grâce à la nature dynamique du cytosquelette d'actine. Cette dynamique est assurée par des remaniements permanents du réseau de filaments contrôlés par les ABP.

Les images de gauche de la figure 3.2 présente la structure du cytosquelette d'actine par microscopie électronique et met en évidence dans la large protrusion, un réseau branché avec une concentration importante de filaments. L'illustration de droite détaille l'emplacement des principales structures mécaniques. Dans le lamellipode, les filaments bleus sont engagés dans la protrusion et adopte un *treadmilling*. Cette structure branchée multiplie le nombre de têtes au contact de la membrane. Le réseau contractile est représenté par les structures : **pb** (câbles périphériques), **sf** (fibres de stress) et **ar** (arcs). Le réseau est ainsi interconnecté à

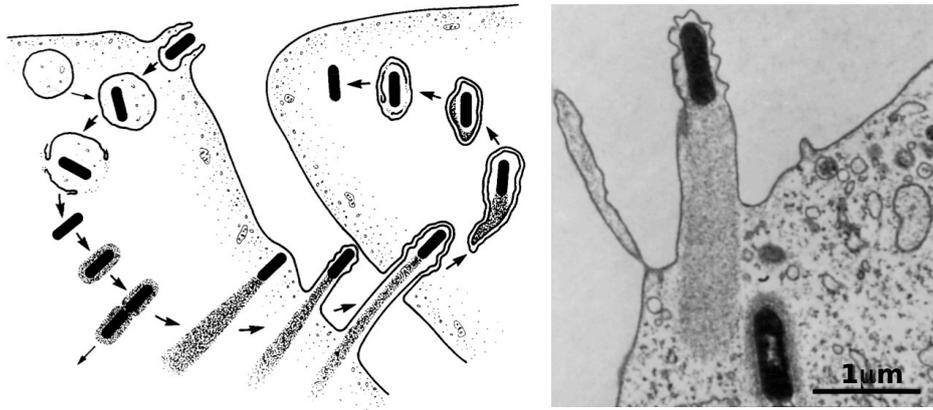


FIG. 3.3 – Extrait de (Tilney et Portnoy, 1989). À gauche : Représentation schématique du cycle infectieux de *L. monocytogenes*. À droite : Image par microscopie électronique de *L. monocytogenes* propulsée par une comète d'actine

travers l'ensemble de la cellule et ancré au substrat grâce aux points d'adhésion.

3.2 La *listeria monocytogenes* et autres pathogènes

Certains organismes cellulaires ne possèdent pas de cytosquelette d'actine et plusieurs pathogènes intracellulaires détournent la polymérisation de l'actine de la cellule envahie pour se propulser. De tels organismes n'utilisent qu'une partie des mécanismes biochimiques nécessaires à la motilité et c'est pourquoi ces systèmes simplifiés servent de modèles dans la compréhension des processus impliqués dans la motilité cellulaire.

Le cas le plus connu et le plus étudié dans la communauté scientifique est celui de la bactérie *Listeria monocytogenes*. Ce pathogène responsable de la listériose humaine est capable de survivre et de croître à l'intérieur de la plupart des cellules de l'hôte infecté. Chez l'homme, le vecteur principal de la contamination est d'origine alimentaire en traversant la barrière intestinale (Schlech *et al.*, 1983). La particularité de *L. monocytogenes* est qu'elle utilise l'actine de la cellule hôte comme moteur pour se mouvoir et se disséminer dans l'organisme en passant de cellules en cellules et en évitant ainsi le système immunitaire. Le cycle infectieux de la bactérie est décrit en figure 3.3.

3.2. LA *LISTERIA MONOCYTOGENES* ET AUTRES PATHOGÈNES

Plusieurs protéines essentielles exprimées par la bactérie lui permettent de retourner la biochimie de l'hôte en sa faveur. L'internaline, protéine de sa surface permet à la bactérie d'être internalisée dans la cellule hôte par interaction avec une épithéliale cadhérine (Mengaud *et al.*, 1996; Lecuit *et al.*, 1997). La bactérie est phagocytée par son hôte puis elle lyse la membrane pour devenir libre dans le cytoplasme. C'est alors qu'elle est capable d'induire la polymérisation des filaments d'actine grâce à une protéine de sa surface ActA (Kocks *et al.*, 1995). Cette dernière active de la même manière que N-WASp, le complexe Arp2/3 (Welch *et al.*, 1997). L'actine recrutée forme d'abord un nuage autour de la bactérie. Les filaments d'actine s'organisent pour former une longue comète qui propulse la bactérie à une vitesse d'environ 1 $\mu\text{m/s}$ dans le cytoplasme. Les extrémités barbées sont dirigées vers la membrane de *L. monocytogenes* (Tilney et Portnoy, 1989; Dabiri *et al.*, 1990; Theriot *et al.*, 1992). Lorsque la tête de la bactérie atteint la surface de l'hôte infecté, la force générée par la comète déforme la membrane et *L. monocytogenes* infecte la cellule adjacente par phagocytose. Finalement, elle devra lyser deux membranes plasmiques avant de pouvoir continuer sa prolifération.

Hormis les monomères d'actine, l'ATP et ActA, seules quelques protéines interviennent dans la propulsion de la bactérie. Loisel *et al.* (1999) ont fermement établi grâce à la reconstitution in-vitro de la motilité de *L. monocytogenes* que le système n'a besoin que du complexe Arp2/3, de l'ADF et des protéines de coiffe.

D'autres pathogènes utilisent la polymérisation de l'actine pour se propulser de la même manière que *L. monocytogenes* tels que : la bactérie *Shigella* responsable de dysenteries (Egile *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 2000), *Vaccinia*, un virus qui provoque une maladie proche de la variole (Locker *et al.*, 2000) ou *Rickettsia* à l'origine de fièvres et du typhus exanthématique (Heinzen *et al.*, 1993; Charles *et al.*, 1999). Dans ces systèmes, les mécanismes provoquant la polymérisation de l'actine ne sont pas complètement compris et les protéines intervenant

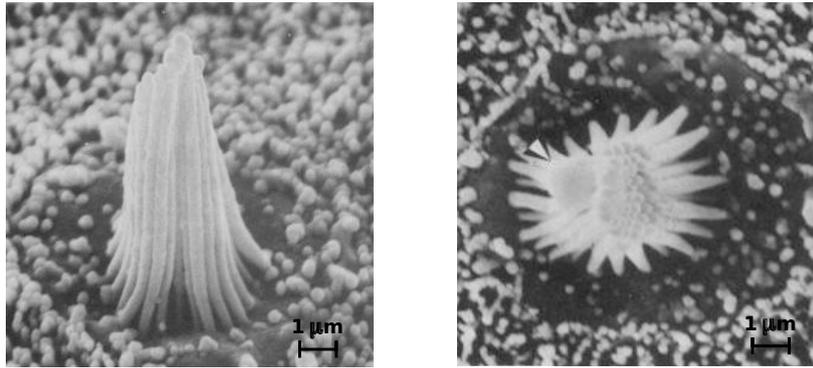


FIG. 3.4 – Images par microscopie électronique d'un cône ciliaire constitué de stéréocils (Hudspeth et Jacobs, 1979).

dans ces processus ne sont pas toutes identifiées (Frischknecht et Way, 2001) :

3.3 *Stereocilia* et la réaction acrosomienne

D'autres systèmes biologiques utilisent les propriétés mécaniques des filaments d'actine. L'oreille interne des vertébrés est constituée du vestibule, organe de l'équilibre, et de la cochlée ou limaçon, responsable de l'audition. La cochlée est un organe tapissé de cellules ciliées formées de stéréocils ou *stereocilia*. Ces cellules sont connectées à la membrane basilaire qui sépare la cochlée en deux chambres. L'ensemble constitue l'organe de Corti. Chaque cellule ciliée est constituée de 20 à 300 stéréocils (FIG 3.4) et forme un cône ciliaire libre de vibrer (Eguiluz *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2003; Tinevez *et al.*, 2007). Les cils sont constitués d'un cytosquelette d'actine d'au moins 3000 filaments formant une structure câblée dont seuls quelques filaments se prolongent dans le corps cellulaire pour ancrer le cil à sa base. En appliquant une force sur la cellule ciliée, Howard et Ashmore (1986) ont montré que la rigidité de l'ensemble est proportionnelle au nombre de stéréocils. Ils estiment la valeur du module d'Young, ou module de courbure, pour un filament d'actine dans la structure égale à 1,6 GPa, soit une valeur relativement proche de la rigidité observée dans les muscles. Un autre mécanisme impliquant un assemblage d'actine découvert par Tilney *et al.* (1973)

3.3. *SEREOCILIA ET LA RÉACTION ACROSOMIENNE*

concerne le processus de fécondation de plusieurs animaux aquatiques et amphibiens comme les oursins. Les spermatozoïdes libérés dans l'environnement local retrouvent les oeufs par chimiotaxie grâce à la gelée qui entoure ces derniers. Les spermatozoïdes s'attachent à l'oeuf grâce à des récepteurs de surface et la réaction acrosomienne est initiée. Cette réaction se déroule en deux étapes : la rupture de l'acrosome et l'émission du prolongement acrosomien. L'acrosome est une poche membranaire située sur la tête du spermatozoïde et contenant une vingtaine d'enzymes. Après contact de l'acrosome avec l'oeuf, les enzymes sont libérées et digèrent la membrane et la gelée. Le prolongement acrosomien est une excroissance membranaire induite par la polymérisation des filaments d'actine. Les filaments s'étendent rapidement et la force ainsi générée allonge l'excroissance. Chez l'holothurie ou concombre de mer, ce prolongement peut atteindre une longueur de 90 μm en 10 s (Inoué et Tilney, 1982). Le contact du faisceau acrosomien avec la membrane de l'oeuf produit une réaction locale de la membrane qui se soulève pour former un cône de fertilisation. La membrane du cône se rompt alors et fusionne avec celle du spermatozoïde. Le cytoplasme du spermatozoïde et son noyau sont finalement propulsés dans l'oeuf par contraction du prolongement acrosomien.

CHAPITRE 3. FORCES MÉCANIQUES DANS LES SYTÈMES BIOLOGIQUES

La polymérisation comme moteur

4.1 Propriétés mécaniques et élastiques des filaments d'actine

4.1.1 Étude d'un filament

4.1.1.1 Fluctuations thermiques et courbure d'un filament

Pour décrire la flexibilité d'un polymère, on définit la longueur de persistance λ_p pour laquelle il se courbe significativement en réponse aux fluctuations thermiques. Le polymère adopte une direction persistante sur toute cette longueur.

La capacité d'un matériau à se courber dépend de ses propriétés élastiques et λ_p est proportionnelle au module de courbure EI , tel que

$$\lambda_p = \frac{EI}{k_B T} \quad (4.1)$$

où E est le module d'Young, I le moment d'inertie d'une section du polymère, k_B la constante

Polymère	Longueur biologique L	Longueur de persistance λ_p
Microtubule	$L \ll \lambda_p$	5 mm
ADN	$L \gg \lambda_p$	50 nm
Actine	$L \simeq \lambda_p$	15 μ m

TAB. 4.1 – Longueur de persistance de différents polymères biologiques. ADN, (Hagerman, 1988) ; Actine, (Yanagida *et al.*, 1984) ; Microtubule, (Gittes *et al.*, 1993)

de Boltzman et T la température.

Il existe plusieurs polymères biologiques, dont les longueurs de persistance sont reportées dans le tableau 4.1. Ces polymères se différencient d'un point de vue physique par leurs propriétés élastiques et mécaniques mais aussi d'un point de vue biologique par les différentes fonctions qu'ils exercent au sein de la cellule. En définissant r comme étant le rapport entre leur longueur biologique L et leur longueur de persistance λ_p , on distingue différents cas :

- $r \ll 1$: le polymère est rigide et les fluctuations thermiques ne changent pas sa forme,
- $r \gg 1$: le polymère est dit flexible, il ne résiste plus à la force thermique, les deux extrémités du filament sont alors décorréélées et le filament peut adopter différentes configurations,
- $r \simeq 1$: le polymère est dit semi-flexible et adopte un comportement intermédiaire.

Les avancées techniques relatives à la visualisation et à la manipulation des macromolécules ont permis le développement de nouveaux outils expérimentaux qui permettent de mesurer la longueur de persistance de ces biopolymères. De manière générale, ces polymères sont rendus fluorescents et on étudie les fluctuations de la forme du filament soumis aux fluctuations thermiques dans un milieu confiné à deux dimensions par une méthode classique de vidéomicroscopie (FIG 4.1).

Pour des polymères semi-flexibles, il est possible d'estimer λ_p en mesurant la longueur R entre les deux extrémités imposées par la courbure du filament et la longueur L réelle du filament (FIG 4.2) (Takebayashi *et al.*, 1977; Nagashima et Asakura, 1980; Yanagida *et al.*,

4.1. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS D'ACTINE

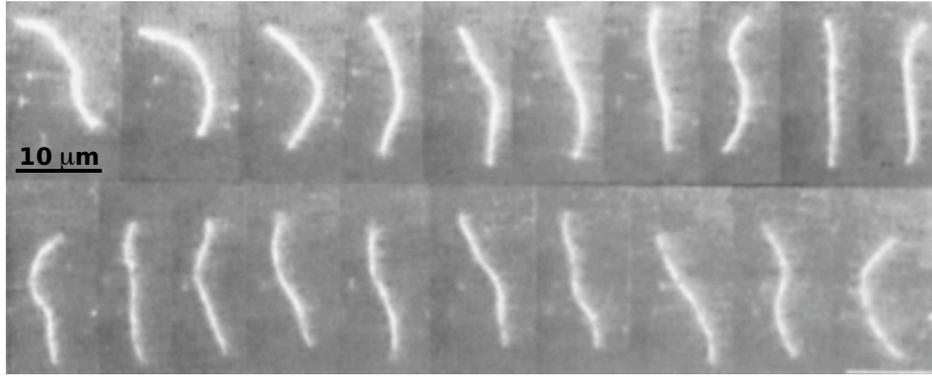


FIG. 4.1 – Images par vidéomicroscopie d'un microtubule (Gittes *et al.*, 1993). Le filament est confiné dans une étroite chambre. Le module de courbure mesurée est $EI = 2,15 \cdot 10^{-23} Nm^2$ pour un microtubule stabilisé.

1984) tel que :

$$\langle R^2 \rangle = 2\lambda_p^2 \left[\exp\left(-\frac{L}{\lambda_p}\right) - 1 + \frac{L}{\lambda_p} \right] \quad (4.2)$$

Pour un polymère rigide tel que les microtubules, cette méthode n'est pas adaptée car les fluctuations des extrémités sont très faibles. Une méthode plus appropriée consiste à corrélérer les fluctuations thermiques du filament et à analyser la forme entière du filament (Ott *et al.*, 1993; Isambert *et al.*, 1995). On définit alors la fonction de corrélation moyenne $\langle C(s) \rangle$ des directions tangentielles θ mesurées sur toute l'abscisse curviligne s du polymère (FIG 4.2) :

$$\langle [C(s)] \rangle = \langle \cos[\theta(s) - \theta(0)] \rangle = \exp\left(-\frac{s}{2\lambda_p}\right) \quad (4.3)$$

Gittes *et al.* (1993) ont analysé les fluctuations des modes hydrodynamiques et ont décomposé $\theta(s)$ comme une superposition de modes de Fourier.

Ces méthodes nécessitent de rendre le polymère fluorescent sur toute sa longueur. Pour se faire on peut le stabiliser par de la rhodamine-phalloïdine ; cette méthode bien que pratique altère les propriétés élastiques et mécaniques du filament. Une autre technique utilise seulement quelques monomères fluorescents qui lorsqu'ils s'incorporent dans le filament le rendent visible. Isambert *et al.* (1995) ont montré sur des filaments où seuls quelques monomères d'actine sont fluorescents que les propriétés mécaniques dépendent de la nature du

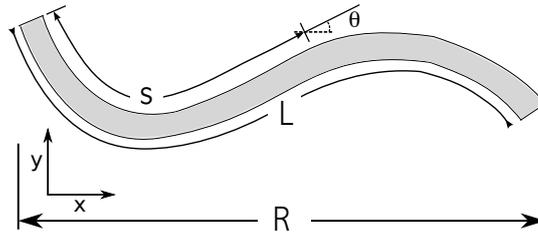


FIG. 4.2 – Analyse des fluctuations thermiques des extrémités d'un filament. s représente l'abscisse curviligne, θ l'angle entre l'axe horizontal et la tangente au filament, x et y les coordonnées de s .

nucléotide, des protéines associées et de la force ionique. Plus récemment, Goff *et al.* (2002) ont étudié les fluctuations d'un filament d'actine dont seules ses extrémités sont marquées.

4.1.1.2 La force de flambement ou force de buckling

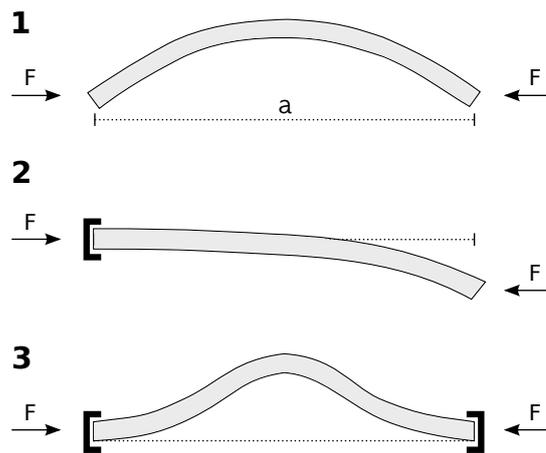


FIG. 4.3 – Filament sous contrainte mécanique. Suivant la libre rotation des extrémités, la force critique ou force de buckling F_b prend différentes valeurs et le filament adopte différentes formes. Cas 1 : $F_b = \frac{\pi^2 EI}{L^2}$. Cas 2 : $F_b = \frac{\pi^2 EI}{4L^2}$. Cas 3 : $F_b = \frac{4\pi^2 EI}{L^2}$.

Considérons à présent un polymère semi-flexible comprimé à ses deux extrémités par une force F . On définit la force d'Euler (Landau et Lifshitz, 1986) ou force de buckling comme :

$$F_{Euler} = F_b = A \frac{k_B T \lambda_p}{L^2} \quad (4.4)$$

tel que pour $F > F_b$, le filament se courbe, on dit qu'il flambe (FIG 4.3). Cette équation tra-

4.1. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS D'ACTINE

duit en quelque sorte la force critique à partir de laquelle le filament commence à ne plus supporter la force appliquée. Pour un matériau avec EI fixé avec $EI = \lambda_p k_B T$, cette force maximale supportée dépend fortement des autres paramètres de l'équation A et L . Le préfacteur A dépend des conditions d'attachement du filament à ces extrémités comme illustré sur la figure 4.3. Par exemple, lorsque les extrémités sont libres de pivoter, A est égal à π^2 . Pour le deuxième paramètre L , plus ce polymère est long et moins il supportera la charge. Pour un polymère comme l'actine, sa longueur augmente au fur et à mesure qu'il polymérise et s'allonge : la force qu'il est capable de supporter diminue. Pour le cas 1 de la figure 4.3, F_b vaut 10 pN avec $L = 200$ nm et $\lambda_p = 10$ μ m.

Récemment, Berro *et al.* (2007) ont analysé les configurations spatiales adoptées par le filament sous l'effet d'une force compressive. L'assemblage est identique à celui de Kovar et Pollard (2004) (Partie 4.2.2.1) et le modèle physique développé permet de tester différentes conditions d'attachement aux extrémités. Ils démontrent ainsi que trois conditions analogues aux cas de la figure 4.3 suffisent à expliquer les différentes formes observées du filament.

4.1.2 Étude d'un gel d'actine

4.1.2.1 Mesures rhéologiques

Comme nous l'avons précédemment évoqué, les propriétés mécaniques du cytosquelette permettent à la cellule de se déformer face au stress extérieur mais aussi de maintenir sa forme. Ces propriétés sont directement induites par la nature viscoélastique des gels d'actine. Pour des déformations rapides, le gel se comporte comme un matériau élastique et se déforme ; pour des déformations plus lentes, il se présente comme un fluide visqueux qui se réorganise en réponse au stress.

Le module élastique traduit la résistance d'un matériau face à la déformation tel que

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (4.5)$$

où σ est la contrainte et ε la déformation. Le module élastique d'une cellule est de l'ordre de 1000 Pa soit bien supérieure aux premières mesures effectuées *in vitro* uniquement sur des filaments d'actine. Les études se sont alors orientées vers des gels d'actine réticulés mettant en évidence le rôle des ABP dans les propriétés viscoélastiques du réseau cellulaire. Les premières mesures sur des réseaux branchés ont montré que de faibles changements de concentration en protéines réticulantes altéraient fortement le module élastique du réseau (Janmey *et al.*, 1986; Wachsstock *et al.*, 1994; Janmey *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 2000). Par ailleurs, Gardel *et al.* (2006) ont retrouvé *in vitro* les mêmes propriétés élastiques cellulaires sur un gel réticulé par des protéines de la famille des filamines avec des longueurs de filaments équivalentes aux longueurs physiologiques du cortex d'actine.

Des études récentes (Gardel *et al.*, 2004; Storm *et al.*, 2005; Gardel *et al.*, 2006) ont montré qu'il existe deux régimes d'élasticité. Le premier, d'origine enthalpique, est rencontré pour de faibles concentrations en réticulant : les points de réticulation sont très espacés, les filaments subissent la contrainte indépendamment les uns des autres et flambent pour supporter le stress. En revanche, pour un réseau réticulé dense, le second régime est gouverné par une élasticité entropique. Les déformations induites par la contrainte se répartissent uniformément dans le réseau, le stress est absorbé par le réseau qui réagit comme un ressort. Chaudhuri *et al.* (2007) ont observé ces deux régimes au sein d'un même gel (FIG 4.4) en fonction de la contrainte σ imposée.

Des protéines réticulantes comme la fascine ou la fimbrine organisent l'actine sous forme de câbles. Malgré la forme identique de ces structures, ces dernières s'inscrivent dans des mécanismes cellulaires différents. Claessens *et al.* (2006) ont démontré expérimentalement que le module de courbure des câbles dépend du type de réticulant utilisé, de sa concentration et de la taille du câble.

La difficulté dans la compréhension mécanique de ces structures est donc de relier à la fois

4.1. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS D'ACTINE

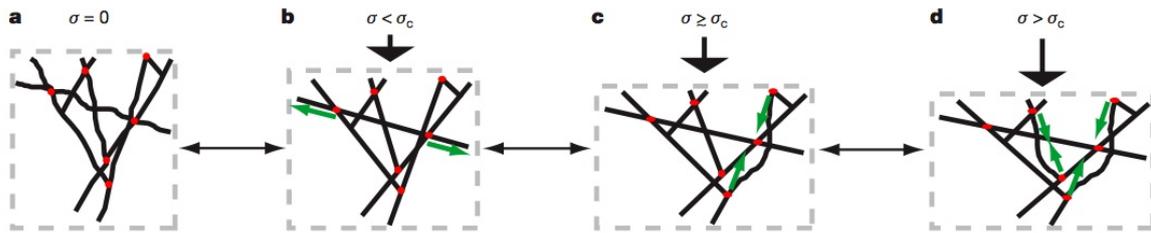


FIG. 4.4 – Modèle théorique d'un réseau (Chaudhuri *et al.*, 2007). La contrainte est représenté par la flèche noire au-dessus des vignettes. **a,b**, Pour un stress $0 < \sigma_c < \sigma$, le gel est étiré latéralement, l'élasticité entropique est augmentée. **c,d**, Pour un stress $\sigma_c < \sigma$, la compression plus imporante que le force d'Euler flambe les filaments et ces derniers ne contribuent plus à l'élasticité du réseau.

le nombre de filaments N et la géométrie de la structure au module de courbure (Heussinger *et al.*, 2007). Suivant ces différentes valeurs, le modèle théorique prédit par Bathe *et al.* (2008) met en évidence différents régimes de flambement des câbles permettant de mieux appréhender le comportement mécanique de ces structures.

4.1.2.2 Mesures élastiques sur des systèmes biomimétiques

Pour analyser les propriétés élastiques et mécaniques des gels d'actine, différents systèmes ayant pour but de mimer et de simplifier les mécanismes biologiques, ont été mis au point. Ces systèmes simplifiés, dits biomimétiques utilisent un matériau de géométrie connu comme support d'étude et les espèces biologiques mises en jeu sont réduites à un petit nombre. Le fait que *L. monocytogenes* peut utiliser la polymérisation de l'actine pour se mouvoir a conduit aux premiers systèmes biomimétiques pour reconstituer la motilité in vitro. Les premiers supports utilisés étaient des particules de latex recouvertes d'un activateur (ActA ou N-WASp) dans le but de localiser la polymérisation de l'actine sur la surface du support. Ces objets sphériques une fois plongés dans un extrait cellulaire ou dans un milieu minimal de protéines nécessaires à la motilité, développent un gel d'actine à leur surface (Loisel *et al.*, 1999). Après brisure de la couronne d'actine, le gel prend la forme d'une comète, les objets se déplacent propulsés par la polymérisation de l'actine (Cameron *et al.*, 1999; Noireaux *et al.*, 2000).

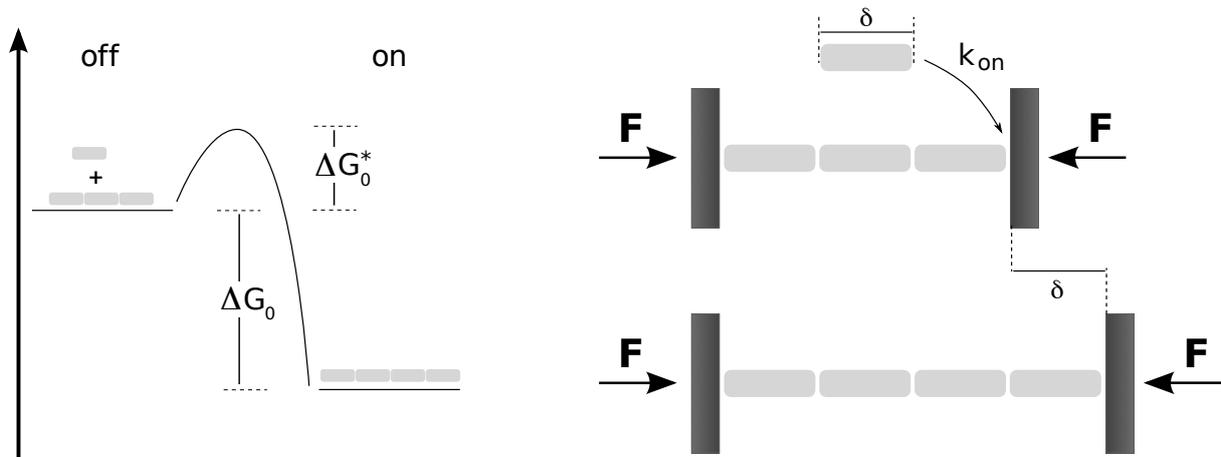


FIG. 4.5 – Approche thermodynamique de la polymérisation d’un filament contre une charge. **À gauche.** Diagramme énergétique d’un filament à l’addition d’une sous-unité et en absence de charge. **À droite.** Filament comprimé à ces deux extrémités.

Les études suivantes ont permis d’étudier la structure élastique des gels ainsi obtenus en mesurant leur module élastique. Ainsi, Gerbal *et al.* (2000b), Marcy *et al.* (2004) et Parekh *et al.* (2005) obtiennent des valeurs similaires de l’ordre de quelques milliers de Pascals caractéristiques d’un gel élastique.

4.2 Profil force-vitesse

4.2.1 Modèles théoriques

4.2.1.1 Approche thermodynamique : cas d’un filament

Pour prédire comment l’énergie chimique peut être convertie en travail mécanique, Hill (1981) entreprit une analyse thermodynamique du problème. En absence de charge, l’énergie chimique libérée à chaque sous-unité insérée prend la valeur ΔG_0 (FIG 4.5) et les constantes d’association et de dissociation, k_{on}^0 et k_{off}^0 respectent la relation

$$\frac{k_{on}^0}{k_{off}^0} = \exp\left(\frac{\Delta G_0}{k_B T}\right) \quad (4.6)$$

En présence de la charge et de la force F (FIG 4.5), l'insertion d'un monomère déplace la charge d'une distance δ égale à la taille de la sous-unité et la quantité de travail réalisée est $W = F\delta$. L'énergie libérée ΔG_F après l'insertion n'est pas simplement égale à ΔG_0 puisqu'une partie contribue au travail W tel que

$$\Delta G_F = \Delta G_0 - F\delta \quad (4.7)$$

Les constantes k_{on} et k_{off} sont données par la même équation que l'équation (4.6) :

$$\frac{k_{on}(F)}{k_{off}(F)} = \exp\left(\frac{\Delta G_F}{k_B T}\right) \quad (4.8)$$

et selon les équations (4.6), (4.7) et (4.8), on a

$$\frac{k_{on}(F)}{k_{off}(F)} = \frac{k_{on}^0}{k_{off}^0} \exp\left(-\frac{F\delta}{k_B T}\right) \quad (4.9)$$

La *stalling* force ou force d'arrêt est la force nécessaire pour maintenir la vitesse de polymérisation nulle dans le cas où toute l'énergie libérée est utilisée. Le système est à l'équilibre et $k_{on}(F_{stall}) = k_{off}(F_{stall})$. D'après l'équation (4.9), cet équilibre se traduit par

$$F_{stall}\delta = \Delta G_{F_{stall}} = k_B T \ln \frac{k_{on}^0 [C]}{k_{off}^0} \quad (4.10)$$

En présence de l'objet, les constantes $k_{on}(F)$ et $k_{off}(F)$ dépendent de la force comme l'indique la relation (4.9). Cependant, la manière dont ces deux grandeurs vont en être affectées n'est pas prédite par le modèle. Pour marquer ces dépendances, on introduit le paramètre q , tel que

$$\begin{cases} k_{on}(F) = k_{on}^0 \exp\left(-q \frac{F\delta}{k_B T}\right) \\ k_{off}(F) = k_{off}^0 \exp\left((1-q) \frac{F\delta}{k_B T}\right) \end{cases} \quad (4.11)$$

En l'absence d'une charge, la vitesse de polymérisation est un simple produit entre la taille d'une sous-unité et la différence entre les constantes d'association et de dissociation tel que

$$v = \delta (k_{on}[C] - k_{off}) \quad (4.12)$$

Selon les équations (4.11) et (4.12), la vitesse de polymérisation peut être réécrite et on obtient

$$v(F) = \delta \left[k_{on}^0[C] \exp\left(-q \frac{F\delta}{k_B T}\right) - k_{off}^0 \exp\left((1-q) \frac{F\delta}{k_B T}\right) \right] \quad (4.13)$$

Le paramètre sans dimension q permet de « distribuer » le travail $F\delta$ sur $k_{on}(F)$ et $k_{off}(F)$, et de tester l'influence de la charge sur les constantes. Il est cependant difficile de trancher quant à la valeur de q . Le cas $q < 0$ est peu probable puisque la polymérisation serait stimulée par la force, et il est raisonnable d'attribuer une valeur positive à q . En général et par simplicité, on considère $q = 1$ et la dépolymérisation n'est pas affectée par la présence de la charge et la vitesse devient

$$v(F) = \delta \left[k_{on}^0[C] \exp\left(-\frac{F\delta}{k_B T}\right) - k_{off}^0 \right] \quad (4.14)$$

Pour $q < 1$, la dépolymérisation est favorisée alors que pour $q > 1$, c'est la polymérisation qui prend le dessus.

4.2.1.2 Le modèle du Brownian Ratchet

Si l'analyse de Hill (1981) rappelle les contraintes thermodynamiques, ce modèle ne propose pas, à l'inverse du **Brownian Ratchet**, un mécanisme.

Le modèle du Brownian Ratchet ou *cliquet thermique* établi par Peskin *et al.* (1993) a été le premier mécanisme proposé pour décrire comment le processus de polymérisation de l'actine peut générer une force.

Dans ce modèle, représenté en figure 4.6, on considère un filament qui polymérise contre une charge. Cette charge fluctue et est soumise au mouvement thermique. Son coefficient

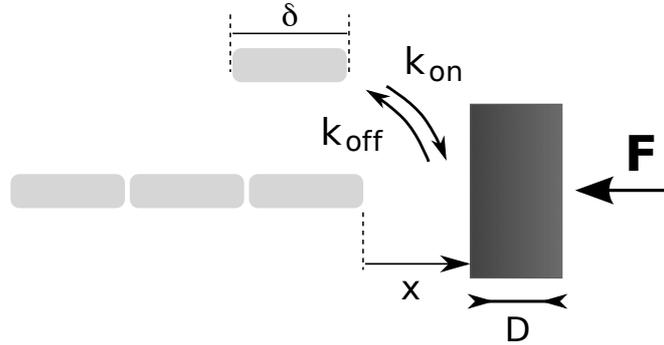


FIG. 4.6 – Représentation schématique du mécanisme du Brownian Ratchet pour la génération de la force par polymérisation.

de diffusion est D et cet objet appuie sur l'extrémité du polymère avec une force F . Dans ce modèle, l'insertion des monomères n'est permise que si l'espace x entre l'extrémité du filament et la charge est égale à δ . Si cet espace est suffisamment large et qu'une protéine est présente, alors cette sous-unité s'intercale, on parle de ratchet ou de cliquet. En présence de la charge, la probabilité $P_{x>\delta}$ d'avoir un espace x plus grand que la taille δ d'une sous-unité réduit le taux de polymérisation tel que

$$k_{on}(F) = k_{on}^0 P_{x>\delta} \quad (4.15)$$

La relation (4.12) reste vraie et la vitesse de polymérisation en présence de la charge devient

$$v(F) = \delta \left(k_{on}^0 [C] P_{x>\delta} - k_{off}^0 \right) \quad (4.16)$$

Deux régimes limites sont proposés :

– Régime limité par la diffusion

Dans ce cas limite, l'espace n'est pas toujours accessible à la sous-unité. Dès que l'espace s'ouvre suffisamment, un monomère est disponible pour s'intercaler. Le taux de polymérisation est limité par le temps nécessaire à la charge pour diffuser d'une distance δ tel que

$$T_{\delta} = \frac{\delta^2}{2D} \quad (4.17)$$

La vitesse de cet objet ainsi « ratcheté » est

$$v(F) = \frac{\delta}{T_{\delta}} = \frac{2D}{\delta} \quad (4.18)$$

– **Régime limité par la vitesse de réaction**

Le coefficient de diffusion D est grand et la polymérisation est limitée par la vitesse de la réaction. La probabilité que le gap soit suffisamment large pour accueillir une sous-unité suit une distribution de Boltzmann et est égale à

$$P_{x>\delta} = \exp\left(-\frac{F\delta}{k_B T}\right) \quad (4.19)$$

Selon l'équation (4.16), on retrouve l'expression (4.14) de la vitesse de polymérisation déjà établi par Hill. D'après la relation 2.1, la vitesse devient

$$v(F) = \delta k_{on}^0 \left[[C] \exp\left(-\frac{F\delta}{k_B T}\right) - [C_c] \right] \quad (4.20)$$

Dans cette expression, seul k_{on} est affectée par la présence de la force et $k_{off}(F) = k_{off}^0$. On retrouve le cas intermédiaire de Hill pour $q = 1$. Pour $F = 0$, on retrouve l'expression (4.10) de la *stalling* force préalablement établie par Hill. Pour avoir une idée des vitesses mises en jeu dans ces mécanismes, pour un objet sphérique d'une taille micrométrique qui diffuse à $D = 1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et selon l'équation (4.18), sa vitesse est de $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ et une fluctuation de δ est donc très rapide. Dans ces conditions, le régime est limité par la réaction.

4.2.2 Mesures expérimentales à l'échelle de quelques filaments

4.2.2.1 Estimation de la *stalling force*

Kovar et Pollard (2004) ont, par un astucieux assemblage, mesuré expérimentalement la force générée par un unique filament. Dans leur expérience, l'extrémité pointue d'un filament d'actine est attachée à une surface rigide par une myosine inactive et l'extrémité barbée est cappée par une formine. Le filament qui polymérise au bout barbé est spatialement sous contrainte à ses deux extrémités et se courbe. Dans ces conditions, ils enregistrent pour le filament le plus court qui flambe, une force maximale générée qui vaut au moins 1,3 pN en accord avec la valeur théorique maximale qu'ils estiment dans leurs conditions.

4.2.2.2 Profil force-vitesse d'un microtubule

Dogterom et Yurke (1997) mesurent pour la première fois la relation force-vitesse pour un unique microtubule. Dans l'expérience, le microtubule est confiné entre deux murs plans. L'une des deux extrémités est clampée tandis que l'autre vient flamber sur le mur immobile. La force générée par le microtubule est suffisamment importante pour passer au delà de la force critique d'Euler. La force F_{ext} générée par le microtubule flambé sur le mur est directement déduite de la forme prise par ce dernier et de la vitesse à laquelle il s'allonge.

La simulation, proposée par Mogilner et Oster (1999) et reprise par van Doorn *et al.* (2000), propose une explication au profil force-vitesse obtenu. Elle est basée sur le modèle du *Brownian Ratchet* et considère N filaments répartis près d'une barrière et appuyant avec une force F . Cette barrière fluctue, chaque pas est en $\frac{\delta}{N}$ et les filaments se trouvent à une distance multiple de $\frac{\delta}{N}$. Un filament est choisi au hasard. Si l'extrémité du filament se trouve à une distance plus grande que δ , la taille d'un monomère, alors une sous-unité est ajoutée ou enlevée avec une probabilité $k_{on}.d\tau$ ou $k_{off}.d\tau$ respectivement où $d\tau$ est le pas de temps. Si la distance est plus petite qu'une sous-unité alors les probabilités d'ajoutées ou d'enlevées une

sous-unité sont

$$\begin{cases} k_{on} \cdot d\tau \exp\left(-\frac{F(\delta-x)}{k_B T}\right) \\ k_{off} \cdot d\tau \end{cases} \quad (4.21)$$

La vitesse de la réaction est obtenue en sommant tous les déplacements de la barrière et la simulation ajuste les données expérimentales et valide le mécanisme du *Brownian Ratchet* pour un microtubule.

Cette simulation constitue une approche nouvelle puisque la force n'est pas simplement distribuée sur tous les filaments. Certains d'entre eux ne la « voient » même pas et la contribution de chaque filament est analysée individuellement. La force finale n'est pas une simple somme de chaque force générée par filament.

4.2.2.3 *Stalling force de quelques filaments d'actine*

Il est difficile à partir des mesures en gel de remonter au profil force-vitesse pour un unique filament d'actine. Le nombre N de filaments qui travaillent et génèrent la force est difficile à estimer. L'expérience de Dogterom et Yurke (1997) est difficilement transposable à l'actine à cause de la plus petite taille des filaments.

Pour simplifier l'étude, Footer *et al.* (2007) ont réussi à réduire leur système à un faible nombre de filaments d'actine maintenus contre une charge. Dans cette expérience, un acrosome est attaché à une particule qui est maintenue par une pince optique de raideur κ . Un câble d'environ 8 filaments d'actine est initié à partir de l'acrosome et la bille est confinée près d'une barrière rigide. Les filaments polymérisent par le bout barbé et éloigne la bille du mur d'une distance d au fur et à mesure qu'ils s'allongent. La force est directement proportionnelle à $d\kappa$.

Selon les équations (2.1) et (4.10), la *stalling force* est donnée par

$$F_{stall} = \frac{k_B T}{\delta} \ln \left(\frac{[C]}{[C_c]} \right) \quad (4.22)$$

et varie avec la concentration en monomères. Footer *et al.* (2007) propose pour différentes concentrations en actine de mesurer la valeur de la *stalling force* sur leur système et de vérifier expérimentalement cette relation.

Les résultats enregistrés montrent une phase nette d'élongation du filament qui se termine par un plateau pour des concentrations de $4\mu\text{M}$ et $2\mu\text{M}$ en actine. Pour la plus forte des concentrations, l'origine du plateau ne correspond pas à la mesure de la *stalling force*. En effet, la force appliquée est plus grande que la force de flambement du filament. Pour une concentration égale à $2\mu\text{M}$, la force appliquée est inférieure à la force de flambement et la force d'arrêt est bien induite par la présence de la charge. Cependant, la valeur trouvée correspond à la *stalling force* pour un filament et les auteurs montrent qu'il n'y a pas d'effets coopératifs dans le processus de génération de la force. Ils proposent une force d'arrêt dynamique : la charge n'est vue que par le filament le plus long, et sa longueur varie au contact de la charge par une instabilité dynamique, il dépolymérise et un autre filament plus long prend le relai.

4.2.3 Mesures expérimentales sur des systèmes macroscopiques

4.2.3.1 Profil force-vitesse de gels d'actine

Dans les expériences de Marcy *et al.* (2004), une comète est initiée sur la surface d'une particule maintenue par une fibre flexible d'un côté et en contact avec une micropipette de l'autre (FIG 4.7). L'ensemble tient la comète et appuie sur ses extrémités. L'analyse mésoscopique de Gerbal *et al.* (2000a) reprise par Prost (2001) en symétrie sphérique pour des billes propulsées par la polymérisation de l'actine, permet à Marcy *et al.* (2004) de baser leur

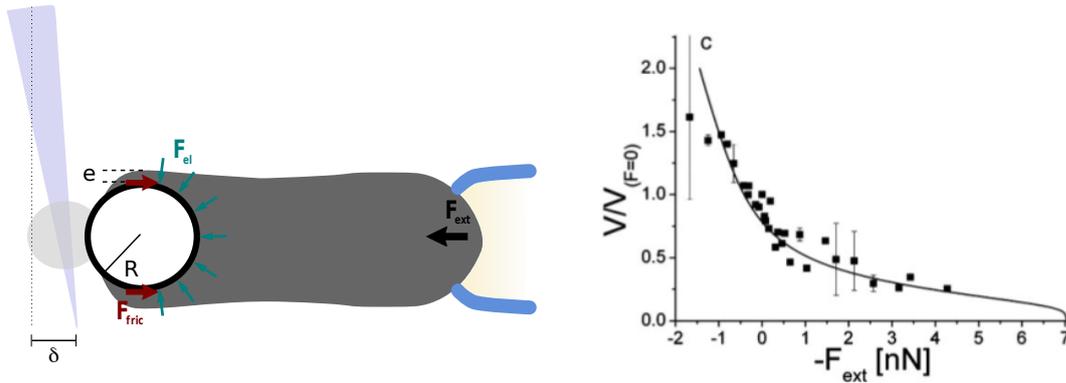


FIG. 4.7 — Schéma expérimental et profil force-vitesse, extrait de (Marcy *et al.*, 2004). La force F_{ext} produite par la poignée flexible est le produit de sa raideur k par la déflexion δ tel que $F_{ext} = \delta.k$

analyse sur cette approche. Dans ce modèle, l'énergie produite par la polymérisation des filaments est emmagasinée sous forme d'énergie élastique puis libérée. Le stress élastique se construit avec la polymérisation telle que l'épaisseur du gel e soit une fonction de la vitesse de polymérisation et de la vitesse du gel. Ils enregistrent une relation force-vitesse pour leur système. Dans ces expériences, la force d'arrêt ne peut être précisément mesurée à cause du flambement de l'ensemble de la comète mais est estimée à 4,3 nN.

Parekh *et al.* (2005) ont utilisé un cantilever d'un microscope à force atomique pour mesurer la relation force-vitesse. Le cantilever sert de support à la polymérisation mais aussi de sonde élastique au gel branché d'actine. Fonctionnalisé avec la protéine ActA, ce dernier est plongé dans un extrait cellulaire cytoplasmique de *Xenopus laevis* et positionné près d'une surface en verre. La polymérisation de l'actine est initiée sur la surface du cantilever et impose une déflexion Δx au fur et à mesure que le gel croît. Le cantilever se comporte comme un ressort de raideur k et la force F exercée est proportionnelle au déplacement. Le profil force-vitesse obtenu possède une allure concave bien différente de celui de Marcy *et al.* (2004). Pour des forces assez importantes, la vitesse reste constante et ne varie pas avec la force. Elle décroît ensuite avec la contrainte jusqu'à la force d'arrêt. Dans ces régimes de vitesse non

dépendants de la force, les auteurs montrent que la vitesse dépend de l'amplitude de la force appliquée auparavant sur le système et que le gel est capable de se réorganiser en réponse à la force.

Conclusion

La force associée à la polymérisation de l'actine est à l'origine de plusieurs mécanismes biologiques fondamentaux comme la migration cellulaire. Ce processus se caractérise par une structure organisée et dynamique du cytosquelette d'actine. Les filaments qui polymérisent derrière la membrane plasmique propulse la tête de la cellule vers l'avant. Cette protrusion cellulaire est constituée d'un réseau branché de filaments en concentration importante. Ce réseau est orienté et les extrémités pointent vers la membrane plasmique. La régulation dynamique du cytosquelette met en jeu des cascades biochimiques qui font intervenir plusieurs dizaines d'*Actin Binding Proteins*.

Notre étude porte sur une petite partie de cette complexe machinerie et se situe à l'interface de la membrane et propose de comprendre comment la polymérisation de l'actine génère une force. En effet, la force produite sur la membrane est attribuée à la polymérisation des filaments d'actine mais les mécanismes à l'origine de la production de cette force ne sont pas déterminés ; de plus à l'échelle de la cellule, les effets collectifs d'une population de N filaments ainsi que les propriétés mécaniques d'un tel réseau restent à déterminer. Plusieurs modèles suggèrent que c'est l'insertion des monomères entre l'extrémité du filament et la

membrane qui génère une force mécanique dite de polymérisation.

La contrainte majeure dans cette étude se situe dans la difficulté technique à mettre en place des outils pour caractériser ces processus. En général, on applique une force connue opposée à la polymérisation qui permet de sonder à la fois les propriétés mécaniques des filaments d'actine et les mécanismes de production de force.

A l'heure d'aujourd'hui, les résultats se situent soit à l'échelle d'un filament ou soit niveau macroscopique. Notre système se place à l'intermédiaire des deux et propose l'étude d'une population de quelques filaments d'actine de manière à avoir une organisation simple du système, pour tenter d'établir un mécanisme de production de force. La technique de la machine de force que nous avons développée permet d'étudier à la fois les propriétés mécaniques des filaments et les mécanismes à l'origine de la force.

Deuxième partie

Des colloïdes magnétiques à la mesure de force

Introduction

La méthode développée pour la mesure de force utilise des colloïdes magnétiques d'une taille micrométrique. La fonction de ces objets magnétiques est double. D'abord, leur taille s'adapte parfaitement aux filaments d'actine et ces particules peuvent servir de support pour manipuler une population de quelques filaments d'actine greffés à leur surface. Ensuite, ces particules permettent d'appliquer une contrainte sur les filaments, puisqu'en présence d'un champ magnétique, les particules s'organisent en chaîne par des interactions dipôle-dipôle et une force compressive est induite sur les filaments. La force magnétique dépend à la fois du champ magnétique appliqué qui est une grandeur connue, de la distance inter-particules et de la susceptibilité des particules χ . Nous détaillons comment mesurer ces deux derniers paramètres pour pouvoir accéder à la valeur de la force magnétique.

Bien que la vitesse d'écartement des particules soit ralentie, la force associée à la polymérisation des filaments est suffisamment grande devant la compression pour écarter les particules au cours du temps. Notre technique par vidéomicroscopie permet d'avoir une résolution temporelle du processus en mesurant la distance inter-particule avec une précision de 20 nm, suffisante pour rendre compte de l'évolution de la croissance des filaments.

Les forces dipolaires magnétiques sont comprises entre 0.1 pN et 100 pN. Comme nous l'avons vu dans la partie I, cette gamme de forces permet d'étudier à la fois les mécanismes à l'origine de la production de la force ainsi que les propriétés mécaniques d'une population d'une centaine de filaments.

Cette partie s'articule en deux chapitres. Un premier chapitre détaille les propriétés des particules magnétiques et un second présente la technique de la machine de force pour la mesure de force.

Les particules superparamagnétiques

Les particules magnétiques s'organisent sous forme de chaîne en présence d'un champ magnétique et une force magnétique attractive dipolaire est induite entre chaque particule.

Nous présentons dans ce chapitre les propriétés des particules magnétiques et détaillons en particulier le calcul de la force magnétique qui sera utilisé pour déterminer la contrainte qui s'applique sur chaque filament.

5.1 Introduction

Les particules sont dites **paramagnétiques** car elles acquièrent une aimantation en présence d'un champ magnétique qui disparaît à l'interruption de ce dernier. L'aimantation de ces objets, caractérisée par une susceptibilité magnétique χ proche de 1, est bien plus grande que dans les matériaux classiques ($\chi \simeq 10^{-3}$) et définit le terme **super**.

Le caractère superparamagnétique des particules provient directement de leur composition. Ces particules sont constituées de grains magnétiques d'oxyde de fer de maghémite $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$

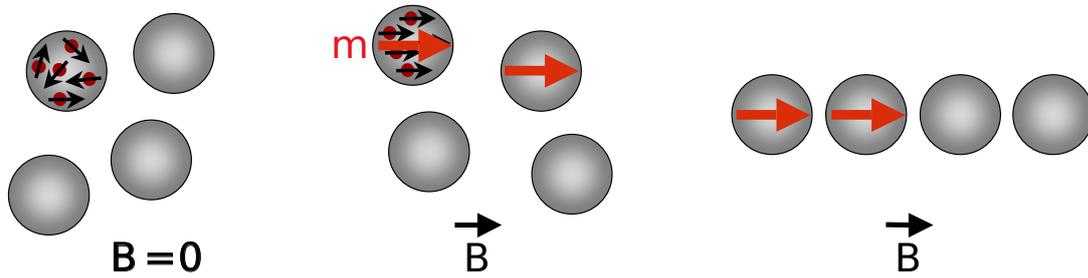


FIG. 5.1 – Orientation des moments magnétiques des grains d’oxyde de fer et du moment magnétique global m des particules sans et avec champ magnétique.

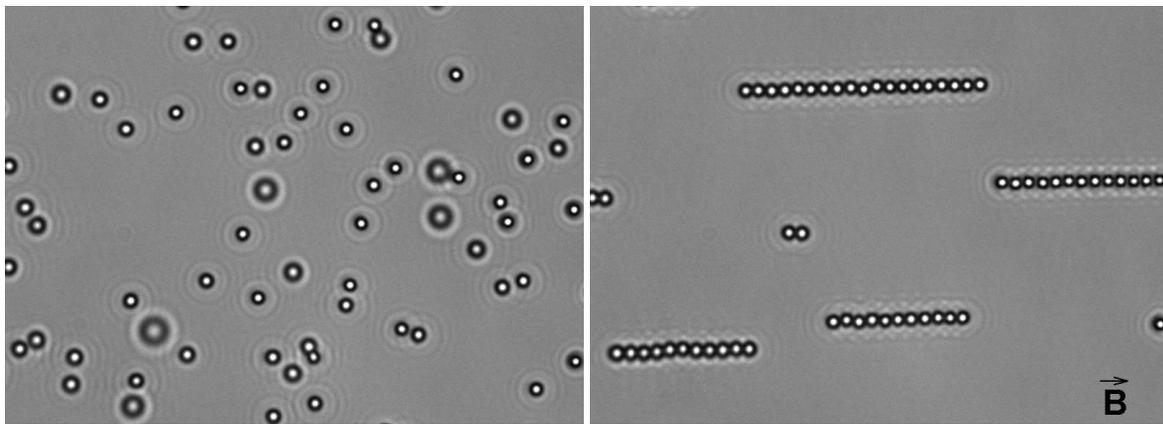


FIG. 5.2 – Images par microscopie optique de particules de $1 \mu\text{m}$ de diamètre pour $B = 0$ et $B = 5 \text{ mT}$.

d’une dizaine de nanomètres encapsulés dans une matrice organique. En absence de champ magnétique, les particules n’interagissent pas entre elles et se comportent comme des objets colloïdaux. Chaque grain possède un moment magnétique orienté aléatoirement en absence de champ (FIG 5.1 et FIG 5.2). En présence d’un champ magnétique, les moments magnétiques s’orientent dans la direction du champ appliqué et un moment magnétique dipolaire induit m est créé au sein de chaque particule. L’interaction dipôle-dipôle entre chaque particule conduit à la formation d’une chaîne linéaire dans la direction du champ. En effet, l’interaction attractive dipolaire est anisotrope : dans la direction du champ, les particules s’attirent mais perpendiculairement au champ, les interactions sont répulsives. Pour minimiser l’énergie magnétique totale, les particules s’organisent sous forme de chaînes.

Taille	Fraction massique	Capacité de capture	Polydispersité
1135 nm	10 mg/ml	2500 pmoles biotines / 1.10^9 billes 15 – 20 μ g IgG biotinyées / 1.10^9 billes	2%

TAB. 5.1 – Caractéristiques des Dynabeads MyOne Streptavidin C1650.01 Dynal-Invitrogen. La taille et la polydispersité ont été mesurées en diffusion de la lumière.

La formation des structures est réversible puisque, après interruption du champ, les attractions dipolaires disparaissent, les moment magnétiques des grains perdent leur orientation. L'agitation thermique suffit alors à détruire l'ordre de la chaîne.

5.2 Fabrication

Les particules utilisées sont des Dynabeads MyOne Streptavidin Dynal-Invitrogen d'un diamètre d'environ 1 μ m dont quelques caractéristiques sont reportées dans le tableau 5.1.

Ces particules sont fabriquées par incorporation de grains d'oxyde de fer dans une matrice poreuse sphérique de latex (Ugelstad *et al.*, 1974; Ugelstad et Mork, 1980; Ugelstad *et al.*, 1993). Une fois la matrice magnétisée, une couche de polymère recouvre et encapsule l'ensemble. Cette couche sert de support pour la fonctionnalisation des particules par des fonctions carboxyles, époxy, amines ou encore thiosils. Les particules que nous avons utilisées dans ce travail sont des particules carboxyliques fonctionnalisées avec des streptavidines liées de manière covalente à la surface. La streptavidine se lie fortement à la biotine avec une constante d'affinité de l'ordre de $10^{-14}M$. Ces propriétés seront utilisées dans la suite pour construire notre assemblage biologique.

Les particules magnétiques sont utilisées dans diverses applications et notamment en biologie et en médecine. Les particules fonctionnalisées avec des objets biologiques comme des antigènes ou des anticorps, sont ainsi dirigées vers des protéines ou des cellules d'intérêt. Une fois l'objet « magnétisé », il peut être détecté, concentré ou encore déplacé. Les

particules magnétiques trouvent ainsi leurs applications dans des tests de diagnostic immunologique, à des fins thérapeutiques (Kim *et al.*, 2002), comme agent de contraste en IRM (Pankhurst *et al.*, 2003) ou encore dans l'isolation et le tri cellulaire. Elles sont aussi utilisées dans la recherche fondamentale pour mesurer la réponse mécanique de systèmes biologiques (Strick *et al.*, 1996; Gosse et Croquette, 2002).

5.3 Calcul de la force magnétique

Nous présentons ici le modèle de Zhang et Widom (1995) qui permet de calculer la force magnétique pour une chaîne infinie. Nous discutons de la validité du modèle pour une chaîne finie de particules. Par ailleurs, le calcul de la force nécessite de connaître la valeur de la susceptibilité des particules magnétiques mesurée en SQUID.

5.3.1 Modèle de Zhang et Widom

Le calcul de la force magnétique F_m s'exerçant entre particules est basée sur le modèle décrit par Zhang et Widom (1995).

L'interaction magnétique est de longue portée et il faut prendre en compte les contributions de tous les voisins. Dans le modèle de Zhang et Widom (1995), on considère une particule de rayon R d'une chaîne infinie espacée d'une distance d de ses voisines, chacune avec un moment magnétique m et soumises à un champ externe B_0 . Chaque particule exerce sur ses voisines un champ magnétique B tel que pour deux particules on a

$$B_{1 \rightarrow 2} = \frac{2\mu_0 m}{4\pi d^3} \quad (5.1)$$

où μ_0 est la perméabilité du vide. Pour une chaîne infinie, chaque particule subit un champ total B qui est la somme du champ appliqué B_0 et le champ local créé par la contribution de

5.3. CALCUL DE LA FORCE MAGNÉTIQUE

toutes les autres particules, et pour une particule i on a

$$B = B_0 + \sum_{\substack{j=-\infty \\ j \neq i}}^{j=+\infty} B_{j \rightarrow i} = B_0 + 2\zeta(3) \frac{2\mu_0 m}{4\pi d^3} \quad (5.2)$$

où $\zeta(3) = \sum_{n=1}^{\infty} 1/n^3 = 1,202$ est la fonction ζ de Riemann.

Le moment magnétique pour un matériau paramagnétique s'écrit

$$m = \frac{4\pi}{3\mu_0} R^3 \chi B \quad (5.3)$$

En combinant les équations (5.2) et (5.3), le moment magnétique m devient

$$m = \frac{4\pi R^3 \chi B_0}{3\mu_0 \left(1 - \frac{4}{3} \zeta(3) \chi \left(\frac{R}{d}\right)^3\right)} \quad (5.4)$$

La force magnétique exercée par une particule sur sa particule voisine est donnée par

$$F_m = \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4} \quad (5.5)$$

Pour une chaîne infinie, il faut tenir compte de la résultante des forces de toutes les autres particules tel que

$$F_m = \sum_{n=1}^{\infty} n \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi (nd)^4} \quad (5.6)$$

Finalement, la force magnétique a pour expression

$$F_m = \xi(3) \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4} \quad (5.7)$$

Cette dernière expression est valable pour un nombre infini de particules. Pour une chaîne de taille finie, des effets de bords apparaissent puisque le champ magnétique local entre chaque particule n'est plus constant et diffère selon l'environnement de la particule. Pour une chaîne d'environ 10 particules, ces effets produisent une erreur de 20% sur la force et une erreur de

2% sur la distance pour les particules des extrémités. Comme nous le verrons dans la suite, les particules des deux extrémités ne seront pas prises en compte.

5.3.2 La susceptibilité magnétique

La force magnétique donnée par l'équation (5.7) dépend du moment magnétique m donné par l'équation (5.4) et de la susceptibilité magnétique χ des particules. Celle-ci est fixée d'une part par les propriétés magnétiques des grains d'oxyde de fer incorporés et d'autre part par la quantité de grains contenue dans les billes. Cette quantité sans dimension est reliée à l'aimantation M et au champ magnétique appliqué B tel que

$$M = \chi \frac{B}{\mu_0} \quad (5.8)$$

L'aimantation est mesurée grâce à un magnétomètre SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*). L'échantillon magnétique est placé dans un champ magnétique B créé par des bobines supraconductrices. Le déplacement latéral de l'échantillon modifie le flux du champ magnétique à travers la boucle supraconductrice et induit un nouveau courant

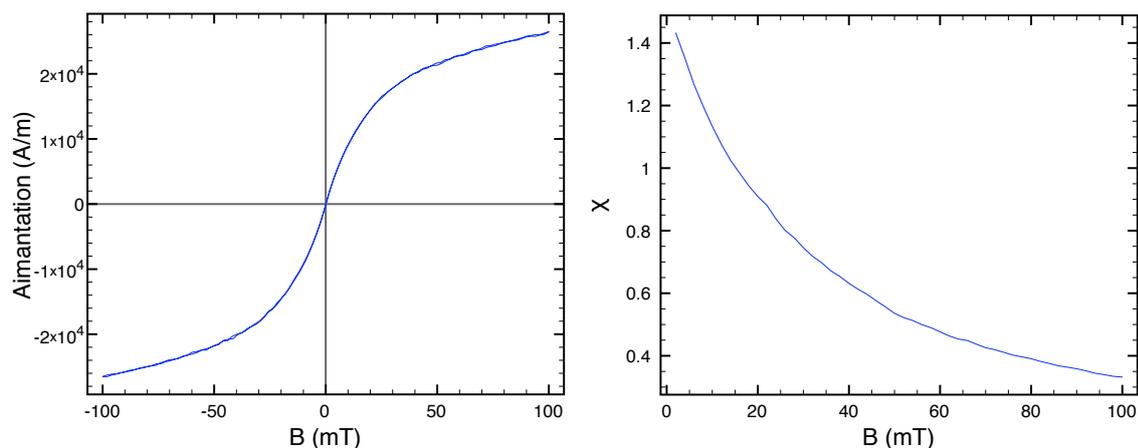


FIG. 5.3 – Données fournies par Dynal-Invitrogen des particules magnétiques MyOne (Fonnum *et al.*, 2005). À **gauche** : Courbe d'aimantation en fonction du champ magnétique B . À **droite** : Susceptibilité χ en fonction du champ magnétique B .

5.3. CALCUL DE LA FORCE MAGNÉTIQUE

dans les bobines. La courbe d'aimantation du ferrofluide ou des particules magnétiques est déduite de la variation d'intensité du courant pour différentes valeurs du champ magnétique. Pour de faibles champs magnétiques, l'aimantation croît linéairement avec B pour saturer vers une constante qui représente l'aimantation à saturation. (FIG 5.3). À cette limite, tous les moments magnétiques sont orientés dans la direction du champ magnétique. La courbe ne présente pas d'hystérésis magnétique. Il n'y a pas d'aimantation rémanente et les moments magnétiques retrouvent une orientation statistiquement isotrope au fur et à mesure que le champ diminue. L'évolution de la susceptibilité magnétique des particules utilisées est représentée sur la figure 5.3.

Mesure des forces colloïdales

Le calcul de force magnétique dépend de la susceptibilité magnétique des particules χ , du champ B et de la distance centre à centre d . La mesure de la susceptibilité détaillée dans le précédent chapitre est à présent connue. Seul le paramètre d reste à déterminer pour pouvoir accéder à la valeur de la force.

Nous présentons dans ce chapitre deux techniques pour mesurer la distance d inter-particules : la machine de force optique et la machine de force par vidéomicroscopie. Nous détaillons en particulier le passage de l'une à l'autre et justifions l'utilisation de la machine par imagerie optique pour l'application aux filaments d'actine.

6.1 Techniques de mesure de forces

Plusieurs techniques expérimentales ont été développées pour mesurer des forces entre surface que ce soient pour l'étude des interactions colloïdales, ou bien l'étude de mécanismes physiques ou biologiques. Les méthodes comme la microscopie à force atomique (AFM)

Technique	Résolution en		
	distance (nm)	force (nN)	énergie/unité de surface ($J.m^{-2}$)
SFA	0,1	5 – 5000	$4.10^{-8} - 2.10^{-6}$
AFM	0,1	1.10^{-3}	2.10^{-6}
Pince optique	20	1.10^{-6}	1.10^{-9}

TAB. 6.1 – Quelques grandeurs comparatives pour l’AFM, le SFA et les pinces optiques.

(Binnig *et al.*, 1986), les pinces optiques (Crocker et Grier, 1994) ou l’appareil à force de surface (SFA) (Tabor et Winterton, 1968), sont basées sur le même principe. On assimile à la pointe de l’AFM, au piège optique des pinces ou aux surfaces d’un SFA, un ressort de raideur k connu. Ce ressort se comprime sous l’effet d’une force extérieure F et on note ΔL son déplacement. La force exercée est proportionnelle à son déplacement et on a

$$F = k\Delta L \quad (6.1)$$

Toute la difficulté dans ces expériences est de mesurer le déplacement ΔL et ces méthodes se différencient à la fois par leur résolution en distance mais aussi par les gammes de forces accessibles (TAB 6.1). La technique des pinces optiques est celle qui permet d’appliquer les forces les plus faibles parmi les trois techniques présentées ici. L’inconvénient de cette technique est qu’elle ne permet de mesurer des forces qu’à longue portée. La technique du SFA donne une mesure absolue de la distance mais sa résolution en force n’est que de l’ordre du nanonewton. À l’inverse, l’AFM bien que facile à mettre en oeuvre, ne donne pas une mesure absolue de la distance mais permet de mesurer des variations de longueurs.

6.2 La machine de force magnétique

La première machine de force a été mise au point par leal Calderon *et al.* (1994) afin de mesurer les forces électrostatiques entre des colloïdes superparamagnétiques et elle s’appuie directement sur les propriétés magnétiques des particules.

6.2.1 Principe de la technique

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, en présence d'un champ magnétique, les particules superparamagnétiques s'organisent sous forme de chaînes. La distance d qui sépare chaque particule est caractéristique de l'équilibre entre les forces répulsives F_r d'origine électrostatique, stérique ou encore entropique et les forces attractives magnétiques F_m . L'équilibre est donné par la relation

$$\vec{F}_r(d) = -\vec{F}_m(d) \quad (6.2)$$

Lorsque le champ magnétique augmente, l'interaction dipolaire entre les particules est plus forte et la distance d diminue : un nouvel équilibre est atteint. Pour chaque valeur du champ magnétique, la distance d d'équilibre du système varie de quelques nanomètres et la relation 6.2 d'équilibre des forces permet de remonter au profil répulsif.

La force attractive magnétique exprimée par la relation (5.7) dépend du champ magnétique appliqué B , de la susceptibilité χ des particules et de la distance d . Les deux premiers paramètres sont connus. Pour avoir accès à la valeur de la force magnétique et donc aux forces électrostatiques, il faut déterminer d .

Dans le dispositif mis au point par leal Calderon *et al.* (1994), la distance d est mesurée par diffraction de Bragg. En présence d'un champ magnétique, les particules sous forme de chaînes se comportent comme un cristal unidimensionnel et diffracte la lumière comme le montre la figure 6.1. La longueur d'onde diffractée suit la loi de Bragg :

$$d = \frac{k\lambda}{n(1 + \cos\theta)} \quad (6.3)$$

où k est un entier positif, λ la longueur d'onde incidente dans le vide, n l'indice du milieu et θ l'angle entre la direction de la lumière incidente et la direction de la lumière diffractée.

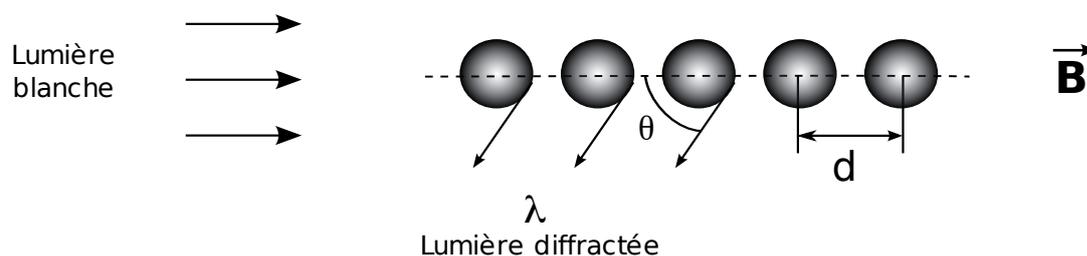


FIG. 6.1 – Principe de la machine de force par diffraction. Les particules sont espacées régulièrement d’une distance d . Lorsqu’elles sont éclairées, elles diffractent la lumière à une longueur d’onde λ caractéristique de d et de θ .

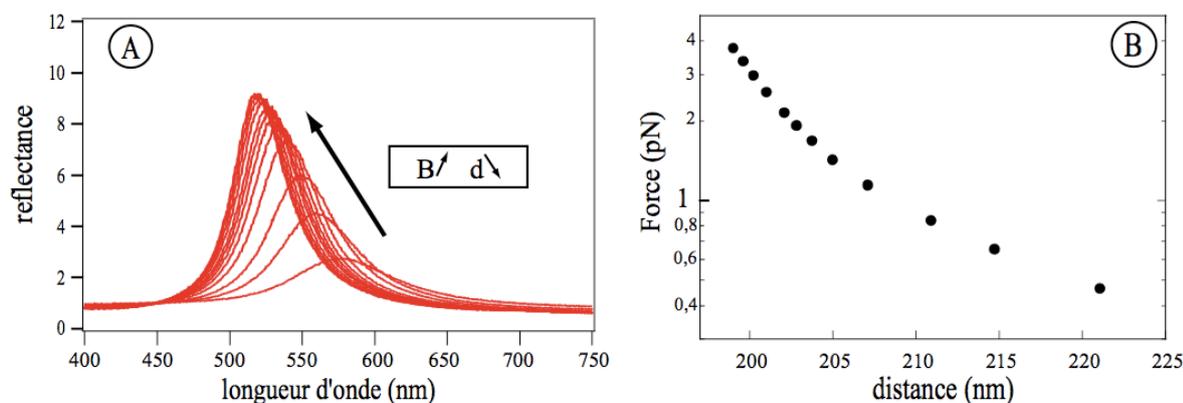


FIG. 6.2 – **A** : Évolution du pic de diffraction en fonction du champ appliqué pour des particules de 200 nm. Évolution de la réflectance r en fonction de la longueur d’onde. r est définie comme $r = \frac{I_m - I_{bg}}{I_{ref} - I_{bg}}$ où I_m correspond à l’intensité mesurée pour un champ donné, I_{bg} et I_{ref} représentent respectivement l’intensité mesurée en absence de lumière et en absence de champ. **B** : Profil de force déduit des pics de diffraction. Évolution de la force en fonction de la distance d . (Cohen-Tannoudji, 2006).

Avec $\lambda = 2nd$, et pour un signal diffracté dans le spectre visible, la taille limite des particules doit être comprise entre 150 et 300 nm. À l’origine les émulsions magnétiques étaient fabriquées à chaque fois. Même si depuis, des particules d’aussi petite taille sont commercialisées, il en existe que peu de types et les billes utilisées sont des particules de 200 nm de la société Ademtech.

À chaque champ magnétique appliqué de plus en plus grand, le pic de diffraction caractéristique de d , se décale vers les petites longueurs d’onde et on remonte au profil répulsif de la figure 6.2. La machine de force par diffraction permit à leal Calderon *et al.* (1994)

de vérifier expérimentalement et pour la première fois sur des colloïdes, la théorie DLVO (pour Derjaguin Landau Verwey Overbeek (Derjaguin et Landau, 1941; Verwey et Overbeek, 1948)) en mesurant les profils électrostatiques de particules chargées par un tensioactif. Plus tard, Mondain-Monval *et al.* (1998) ont mesuré les forces entre des émulsions recouvertes de polymères adsorbés.

Le dispositif expérimental mis au point par Rémi Dreyfus au laboratoire des Colloïdes et Matériaux Divisés consitue une version améliorée de la première machine de force (Dreyfus, 2005). L'échantillon colloïdal placé au coeur d'une bobine est éclairé par une source de lumière blanche et le signal diffracté par la suspension, récupéré au moyen d'une fibre optique. La lumière ainsi guidée est ensuite envoyée vers un spectrophotomètre où les différentes longueurs d'ondes sont séparées puis envoyées sur une caméra refroidie. Cette méthode qui constitue un moyen de caractériser l'état de surface des particules magnétiques à trouvé aussi son application en biologie. En effet, ce dispositif a d'abord permis à Anne Koenig d'étudier les propriétés mécaniques de l'ADN (Koenig, 2005; Koenig *et al.*, 2005), puis à Laetitia Cohen-Tanoudji d'étudier les vitesses d'association entre ligands et récepteurs, entre surfaces (Cohen-Tannoudji, 2006; Cohen-Tannoudji *et al.*, 2008).

6.3 La machine de force par imagerie optique

Un premier prototype de la machine de force par imagerie optique a été conçu par Rémi Dreyfus en collaboration avec Dynal-Invitrogen désireux de caractériser l'état de surface de leur particule de 1 μm de diamètre. Ce dispositif est actuellement utilisé par Dynal-Invitrogen et nous avons développé entièrement un nouveau dispositif au laboratoire.

6.3.1 Passage à la mesure par vidéomicroscopie

Bien que la mise en place de notre système a débuté avec la machine de force par diffraction, la machine de force optique est rapidement apparue comme le choix le plus judicieux pour notre étude. Plusieurs raisons justifient l'abandon des particules de 200 nm au profit de particules de 1 μm de diamètre. D'abord, pour un même champ magnétique, les forces magnétiques dipolaires obtenues avec les grosses particules sont 25 fois supérieures à celles des petites. Pour l'étude d'une population de quelques filaments d'actine, la gamme de force à atteindre doit être comprise entre 1 et 100 pN et il est difficile d'obtenir cette gamme avec les particules de 200 nm.

Par ailleurs, la diffraction du signal dans le visible limite la distance centre à centre des particules à 300 nm. Nous sommes donc limités à la fois sur la taille des particules mais aussi sur la longueur maximale des filaments d'actine puis vont polymériser sur la surface. Au delà de 300 nm, le signal est diffracté dans l'infrarouge. Pour des particules de 200 nm, la longueur des filaments est donc restreinte à 100 nm. Dans nos conditions cinétiques, la polymérisation des filaments d'actine pour cette longueur s'effectue en 5 min. Ce temps est expérimentalement contraignant car il ne laisse la possibilité que d'un très faible nombre de mesures.

Enfin, pour des longueurs de filaments égales au rayon des particules, les fluctuations thermiques rendent la chaîne instable et l'erreur sur la distance devient très importante.

Toutes ces raisons ont donc orienté notre choix pour des objets plus gros, d'un diamètre de 1 μm . L'utilisation de ces particules en diffraction est difficile car l'intensité maximale du signal est diffractée principalement vers l'avant et noyée dans la source lumineuse.

Finalement, la machine de force par vidéomicroscopie s'est avérée la méthode la plus adaptée pour l'étude de notre système.

Microscope	Nikon Eclipse TE2000-E
Objectif	Nikon Plan 100x/1,25 oil
Caméra	Hamamatsu ORCA-ER 12 bits 1344 × 1024 pixels
Platine motorisée	Märzhäuser LSTEP/ECO-STEP
Alimentation	Agilent DC Power Suplly RS-232 Port
Bains thermostatés	HAAKE K10 DC50
	Julabo FS18
Logiciel	NIS-Elements 3.0 Nikon
Capillaire	Vitrocom Réf 5010 100 μm × 1 mm

TAB. 6.2 – Détails du matériel utilisé dans le dispositif expérimental.

6.3.2 Dispositif expérimental

De nombreuses améliorations ont été effectuées par rapport au premier montage tant au niveau de la conception que dans la manière d'analyser les résultats.

L'ensemble du dispositif expérimental s'organise à la fois sur et autour d'un microscope inversé. Les deux bobines ont été spécialement conçues pour, d'une part, s'insérer dans la platine motorisée, et d'autre part pour atteindre des champ magnétiques de 40 mT afin d'obtenir des forces magnétiques au maximum égales à 100 pN.

Les deux solénoïdes sont fixés à un cadre en aluminium et l'ensemble repose sur une platine motorisée (Photos 1 et 2 - FIG 6.3). Les deux bobines encadrent l'objectif pour que l'intensité maximale du champ soit située au niveau de sa lentille. Les bobines chacune entourées d'un tuyau de cuivre sont refroidies grâce à une circulation d'eau thermostatée (Photo 3 - FIG 6.3). Elles sont reliées à une alimentation pilotée par ordinateur. Le cadre en aluminium dispose d'un porte-échantillon qui soutient la lame au-dessus de l'objectif et entre les deux bobines. La solution de particules est contenue dans un capillaire scellé à ses extrémités par de la cire et solidement maintenu à la lame (Photo 4 - FIG 6.3). Le logiciel NIS-Elements développé par Nikon permet de piloter par ordinateur les différents périphériques munis d'un port RS-232 : le microscope, la caméra, la platine et l'alimentation des bobines. Le matériel utilisé est détaillé dans le tableau 6.2.

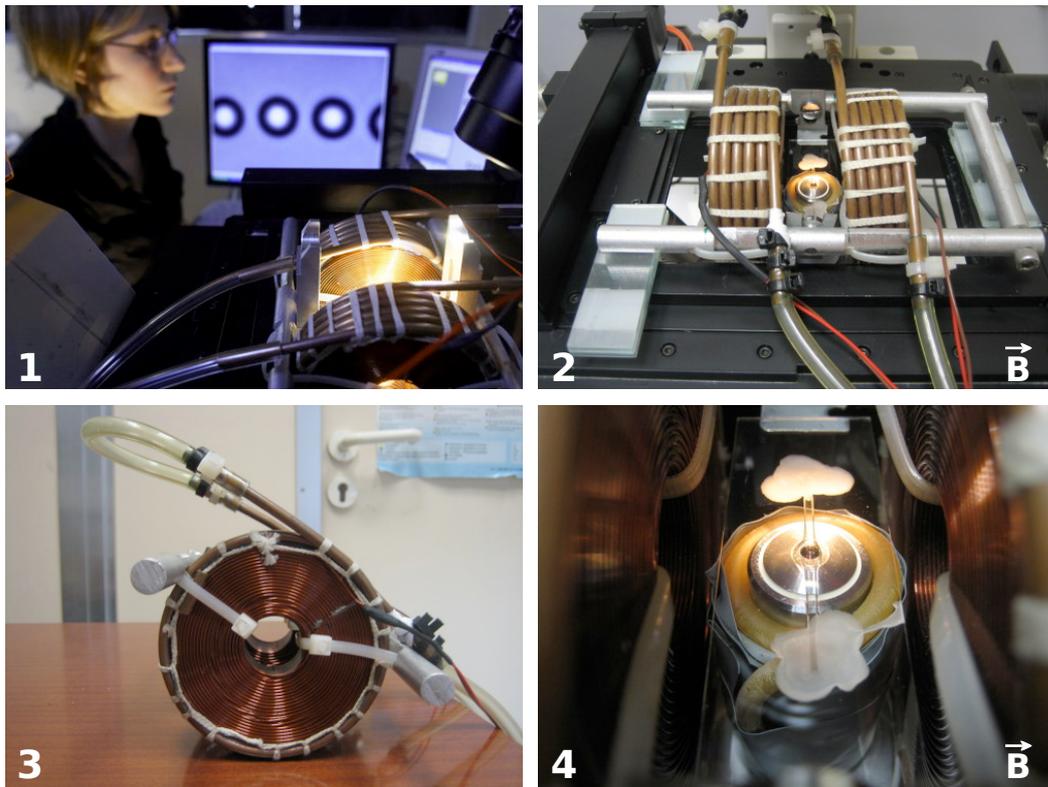


FIG. 6.3 – 1. Vue d'ensemble du montage. 2. Bobines supportées par un cadre en aluminium et reposant sur une platine motorisée. 3. Bobines vues de profil. 4. Echantillon maintenu au dessus de l'objectif.

6.3.3 Principe de la mesure force-distance

6.3.3.1 Analyse des images

La mesure de la distance inter-particules d se fait par traitement d'images grâce au logiciel NIS-Elements. Ce logiciel dispose d'une puissante interface pour analyser des images numérisées. En effet, différents algorithmes permettent d'extraire certaines informations telles que l'aire ou encore les coordonnées x et y de chaque particule constituant la chaîne (Crocker et Grier, 1996). Les images sont numérisées avec une caméra Hamamatsu ORCA-ER 12 bits

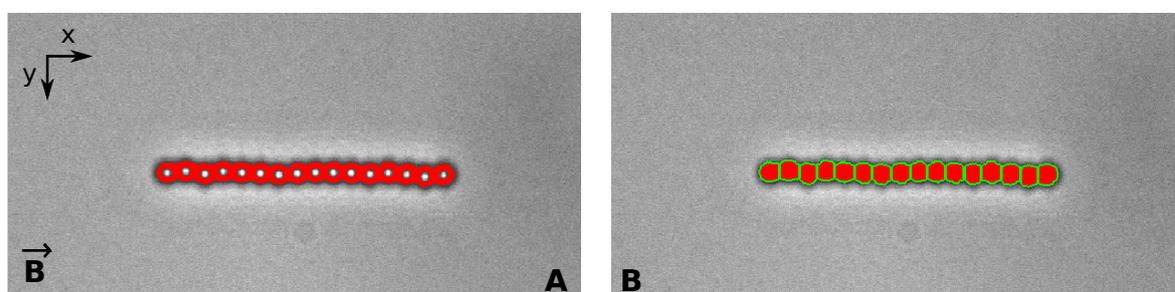


FIG. 6.4 – Principe du traitement d'image. À gauche. Un seuil adapté sur les niveaux de gris les plus sombres permet de sélectionner le contour de la particule. À droite. La fonction « Fill Holes » ramène le contour à une forme entière pleine. Les objets sont ensuite discrémentés et un ensemble d'informations est alors accessible.

permettant de coder les images sur 4096 niveaux de gris. Son capteur CCD est constitué de 1344 pixels horizontaux sur 1024 pixels verticaux. L'objectif $\times 100$ à immersion permet d'obtenir un grossissement final tel que 1 pixel = 64 nm.

Pour extraire l'information sur l'aire ou sur la position de chaque objet, il faut définir un seuil de niveaux de gris adapté. Cette étape associe à tous les niveaux inférieurs à un certain seuil du noir (1), et du blanc (0) à tous les autres : on obtient une image binaire. Pour notre chaîne de particules, il est possible de travailler soit sur le coeur de la particule, soit sur son contour. La première solution donne directement des objets sphériques distincts les uns des autres. Par contre la seconde ne dessine que le contour complet de la chaîne (Photo A - FIG 6.4). Pour que chaque particule retrouve sa forme sphérique, les pixels de l'image sont

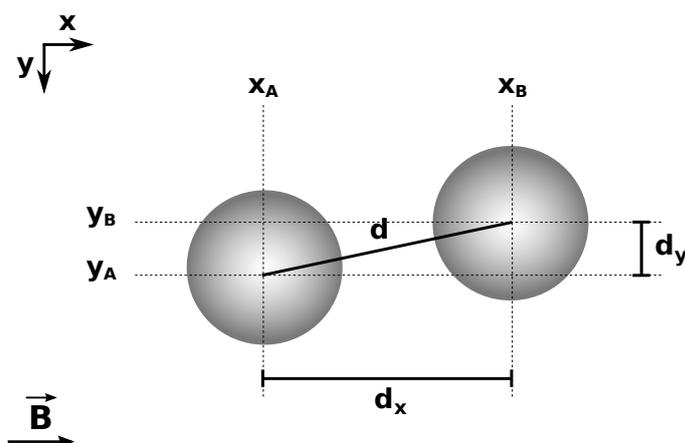


FIG. 6.5 – Paramètres géométriques de deux particules.

traités par rapport à leur voisinage. La fonction « Fill Holes » comble les espaces vides alors que la fonction « Morpho separate object » redonne à chaque particule son identité (Photo B - FIG 6.4). Ces étapes bien qu'efficaces pour discriminer les particules, déforment les sphères en ellipsoïdes. La précision sur le barycentre est directement liée à la surface à partir de laquelle elle est calculée, et la deuxième méthode est donc préférée.

Les particules magnétiques bien que confinées dans la chaîne fluctuent à cause de l'agitation thermique (FIG 6.5). Pour tenir compte de ces fluctuations, la distance exacte séparant deux particules voisines situées dans le même plan est donnée par la relation

$$d = \sqrt{(x_B - x_A)^2 + (y_B - y_A)^2} = \sqrt{d_x^2 + d_y^2} \quad (6.4)$$

En éliminant les deux particules extrêmes (Partie 5.3.1), la distance moyenne $\langle d \rangle$ d'une chaîne à N particules est donnée par la relation

$$\langle d \rangle = \frac{\sum_{i=2}^{N-1} d_i}{N-2} \quad (6.5)$$

6.3.3.2 Longueurs des chaînes

Le logiciel NIS dispose d'un éditeur de langage C pour programmer le pilotage de chaque appareil et analyser les images en direct. Le programme de traitement d'images mis au point ne permet pour le moment d'analyser qu'une seule chaîne par image et le cas de la figure 5.2 ne peut être traité.

Bien que la taille de l'image peut être réduite et ajustée à une seule chaîne, plusieurs paramètres expérimentaux sont optimisés pour s'assurer d'avoir des chaînes suffisamment éloignées les unes des autres et assez courtes pour ne pas sortir de l'image.

D'abord, la fraction massique en particule contenue dans l'échantillon fixe le nombre de chaînes par unité de volume. Celle-ci comprise entre $10^{-2}\%$ et $10^{-3}\%$ donne lieu à des chaînes suffisamment éloignées les unes des autres.

Ensuite l'intensité du champ magnétique appliqué détermine la longueur des chaînes. En effet, pour un champ magnétique fort, les interactions attractives dipolaires portent sur de longues distances : les chaînes s'attirent entre elles et fusionnent pour former très rapidement des chaînes de plus en plus longues ($N_{part} > 20$). À l'inverse pour un champ faible, la portée des interactions dipolaires est plus courte, les chaînes restent isolées les unes des autres. Le temps d'application du champ magnétique détermine aussi la longueur des chaînes et augmente la probabilité qu'elles se rencontrent et fusionnent.

6.3.3.3 Automatisation de la mesure

Après avoir placé l'échantillon entre les deux bobines, on applique un champ magnétique de faible intensité qui permet la formation de chaînes courtes avec $10 < N_{part} < 20$. La taille de l'image est réduite à une zone d'intérêt qui ne contient que la chaîne à étudier et le programme est exécuté.

Bien qu'il existe quelques variantes, le programme suit la logique suivante. D'abord, on

indique les intensités d'alimentation de la bobine à appliquer. La première intensité est envoyée à l'alimentation et les bobines s'ajustent au champ prédéfini. La distance entre chaque particule de la chaîne préalablement sélectionnée s'équilibre quasi instantanément. Après quelques secondes, le logiciel capture une première image et l'analyse. Pour simplifier le calcul de la distance, les coordonnées (x,y) sont organisées selon les valeurs des x croissants. De plus, ce classement permet de s'affranchir facilement des effets de bords en éliminant les deux particules extrêmes. Le calcul de la distance moyenne dans la chaîne est itéré sur le nombre de particules et la force magnétique F_m est calculée selon l'équation (5.7). Bien que le capillaire soit fermé hermétiquement pour éviter tout flux hydrodynamique, la chaîne est soumise aux fluctuations thermiques et se déplace. Afin de maintenir sa position dans la zone d'observation, la platine motorisée est régulièrement déplacée pour coïncider le barycentre de la zone d'observation avec le barycentre de la chaîne. Puis l'intensité suivante est envoyée à l'alimentation et un nouveau cycle commence.

Actuellement, il s'écoule environ 3 s entre le moment où une image est capturée et analysée, et le moment où une autre image est enregistrée. Cette résolution temporelle est suffisante pour notre étude comme nous le verrons dans la partie III et n'a pas été optimisée. Cependant, une résolution inférieure à la seconde est tout à fait envisageable.

6.3.4 Stabilité colloïdale

Dans la machine de force, la stabilité de la suspension est un paramètre déterminant dans la mesure de d . Une solution colloïdale stable est un système qui reste à l'état dispersé. Pour tomber dans le puit d'énergie le plus bas caractéristique de l'agrégation, le système doit passer une barrière d'énergie. Plusieurs facteurs perturbent l'équilibre du système (la concentration en sels, le pH, la température, la présence de protéine chargée sur la surface des particules), alors que d'autres comme des polymères chargés contribuent à maintenir sa stabilité.

Une suspension instable se caractérise par la formation de doublets permanents voire même d'amas de plusieurs particules. En règle générale, pour contrôler la stabilité des particules de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre, des observations en microscopie optique sont suffisantes. En absence de champ, le premier contrôle visuel consiste à s'assurer que l'échantillon ne contient pas d'agrégats de plusieurs particules magnétiques. Puis le champ magnétique permet de tester la stabilité des particules en fournissant de l'énergie pour passer la barrière de stabilité (Goubault *et al.*, 2005). Après avoir maintenu l'échantillon sous champ, une deuxième observation permet de s'assurer que les particules se dispersent correctement et que la formation des chaînes est bien réversible. Ces étapes auront d'autant plus d'importance dans la fonctionnalisation des particules (Section 8.1.1).

6.3.5 Résolution de la mesure

Plusieurs paramètres peuvent affecter la précision sur la mesure de la distance centre à centre $\langle d \rangle$. À la différence de la machine de force par diffraction où la mesure est réalisée en volume, le traitement d'une image ne conduit ici qu'à l'étude d'une chaîne isolée. Le premier facteur influençant la précision de la mesure de la distance est lié à la polydispersité des particules. La taille des particules utilisées, mesurée en diffusion de la lumière, est égale à $1140\ \text{nm}$ avec une polydispersité estimée à 2% soit $\pm 20\ \text{nm}$ ce qui est très faible à l'échelle de la taille des particules mais un peu moins à l'échelle des longueurs de filaments d'actine. La figure 6.6 met en évidence ces effets sur les profils force-distance. Les deux profils ont été réalisés sur des chaînes différentes et chaque point correspond à la moyenne de 10 images. Bien que la forme du profil électrostatique soit la même pour les deux chaînes étudiées, un décalage de $10\ \text{nm}$ les sépare. Pour réduire l'effet de la polydispersité, une stratégie consisterait à moyennner sur plusieurs chaînes dans l'échantillon. Cela nécessiterait de prendre au moins une centaine d'images pour effacer cet effet pour un seul point du profil. Avec le dispo-

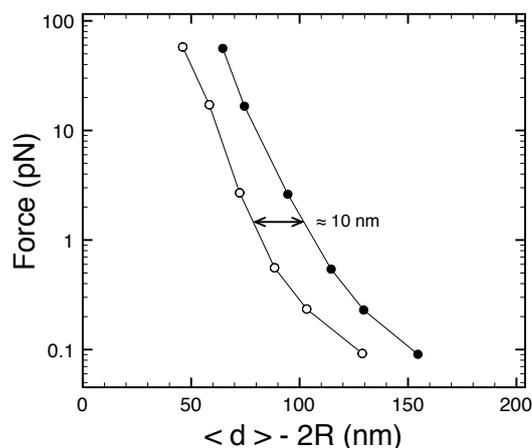


FIG. 6.6 – Effet de la polydispersité et moyenne sur d . Les deux courbes ont été réalisées pour deux chaînes différentes. Chaque point est une moyenne sur 10 images de la chaîne.

sitif actuel, il faudrait environ une journée pour obtenir une courbe complète. Pour minimiser ces effets de polydispersité sur la distance, l'idée est de travailler sur une même chaîne indépendamment de toutes les autres. Pour une chaîne d'environ 10 particules, l'erreur sur la taille des particules n'est plus que de ± 7 nm pour une image.

Pour l'étude concernant les filaments d'actine, chaque profil force-distance sera réalisé sur une chaîne différente, et il est possible que ces effets décalent les courbes en distance de quelques nanomètres d'une expérience à l'autre.

Le deuxième paramètre influençant la mesure de d est la précision intrinsèque du dispositif expérimental liée à la fois à la résolution optique et au bruit environnant. L'analyse d'une particule statique collée sur une lame permet d'en faire une bonne estimation et donne un écart type de 10 nm.

D'après l'équation (5.7), l'erreur sur la force ΔF est liée à la fois à l'erreur sur la distance $\Delta d = 10$ nm, sur le champ magnétique $\Delta B = 0,1$ mT, sur le rayon des particules ΔR lié à la polydispersité estimée à 20 nm et sur la susceptibilité $\Delta \chi$. Cette dernière est difficile à évaluer. De récents travaux (van Ommering et Nieuwenhuis, 2006; Shevkoplyas *et al.*, 2007) à l'échelle de particules individuelles, ont démontré que des particules de même taille et

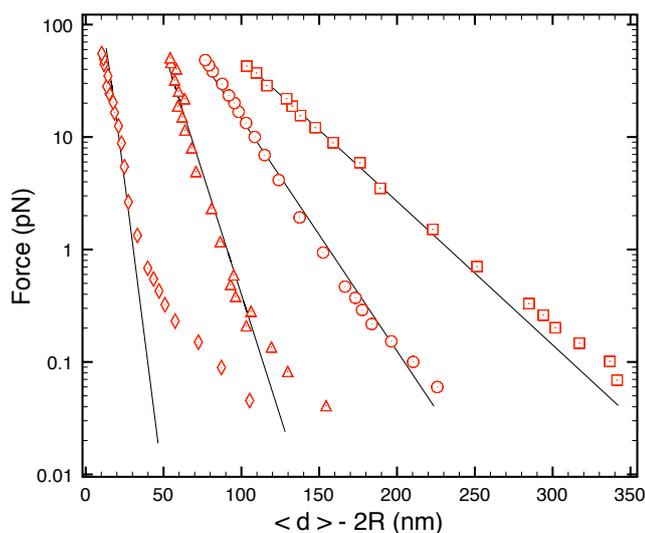


FIG. 6.7 — Profil force-distance pour différentes forces ioniques. Force en fonction de $\langle d \rangle - 2R$ pour différentes forces ioniques : □ $c = 0,07\text{mM}$, $\kappa^{-1} = 34\text{ nm}$; ○ $c = 0,25\text{mM}$, $\kappa^{-1} = 19\text{ nm}$; △ $c = 1\text{mM}$, $\kappa^{-1} = 10\text{ nm}$; ◇ $c = 5\text{mM}$, $\kappa^{-1} = 4\text{ nm}$

d'un même lot présentent des propriétés magnétiques différentes et notamment relèvent des différences dans leur susceptibilité. Cependant, aucune mesure de ce type n'a été réalisée sur les particules que nous utilisons. Dans la partie 6.3.8, nous discutons d'une alternative pour s'affranchir des propriétés magnétiques des particules et déterminer ainsi la valeur de la force magnétique de manière absolue.

En ne tenant compte que de Δd , ΔB et de ΔR , l'erreur sur la force est estimée à 0,1 pN.

6.3.6 Profils électrostatiques

Pour valider la technique de force par vidéomicroscopie, on réalise les profils électrostatiques des particules magnétiques pour différentes forces ioniques représentées sur la figure 6.7. La distance moyenne $\langle d \rangle$ est mesurée selon la méthode de la partie 6.3.3.1 et chaque profil est réalisé sur une même chaîne. Selon la valeur de la force ionique, la portée des interactions électrostatiques est modifiée, ce qui se caractérise par une pente différente pour chaque profil. Dans l'approximation de Derjaguin (Derjaguin et Landau, 1941), le potentiel électrostatique

$u_{el}(d)$ pour une longueur de Debye κ^{-1} bien plus petite que la taille R des particules s'écrit

$$u_{el}(d) = 2\pi\epsilon\psi_0^2 R \ln\left(1 + e^{-\kappa(d-2R)}\right) \quad (6.6)$$

Et avec $F_{el}(d) = u'_{el}(d)$, l'expression de la force électrostatique est donnée par la relation

$$F_{el}(d) = 2\pi\epsilon\psi_0^2 R \kappa \frac{\exp[-\kappa(d-2R)]}{1 + \exp[-\kappa(d-2R)]} \quad (6.7)$$

avec ϵ la permittivité et ψ_0 le potentiel de surface. Cette dernière expression permet d'ajuster chaque profil expérimental avec pour seul paramètre ajustable ψ_0 . Comme l'avait déjà montré leal Calderon *et al.* (1994) avec des particules de 200 nm, ces profils respectent le régime électrostatique aux courtes distances.

6.3.7 Fluctuation thermique : dilatation thermique d'une chaîne à 1D

Les profils de la figure 6.7 respectent la théorie de la DLVO aux courtes distances mais pour des forces inférieures à 0,1 pN environ, les profils dévient. L'origine de cette déviation est toujours restée en suspens et pour l'étudier plus en détail, ces mêmes effets ont été analysés par une simulation de Monte-Carlo en collaboration avec David Lacoste du Laboratoire de Physico-Chimie Théorique de l'ESPCI. Cette analyse étudie l'interaction de deux particules voisines avec un potentiel $u(d)$ dans une chaîne de 10 à 20 particules. Le potentiel d'interaction $u(d)$ peut être décrit comme étant la somme de deux composantes : une composante attractive décrite par le potentiel d'interaction dipolaire $u_m(d)$ et une composante électrostatique $u_{el}(d)$ tel que

$$u(d) = u_m(d) + u_{el}(d) \quad (6.8)$$

Le potentiel d'interaction dipolaire est défini ici comme étant

$$\beta u_m(d) = -\lambda \frac{R^3}{d^3} \quad \text{avec} \quad \beta = 1/k_B T \quad (6.9)$$

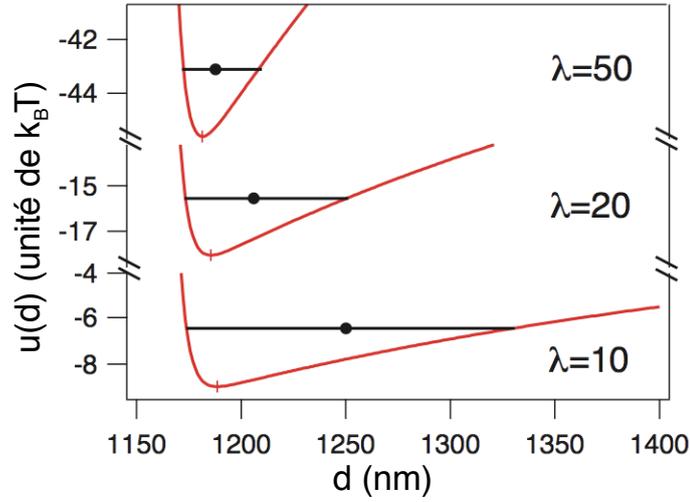


FIG. 6.8 – Potentiel d’interaction théorique $u(d)$ en unité de $k_B T$ en fonction de la distance d . λ est égal à 10, 20 et 50 pour une force ionique égale à 5 mM et un potentiel de surface ψ_0 égal à -35 mV.

où λ est un paramètre sans dimension tel que

$$\lambda = \frac{m^2 \mu_0}{2kT \pi R^3} \quad (6.10)$$

avec m le moment magnétique, μ_0 la perméabilité du vide. Le potentiel d’interaction $u(d)$ est représenté sur la figure 6.8 en fonction de d pour $\lambda = 10$, $\lambda = 20$ et $\lambda = 50$ en unité de $k_B T$. Lorsque d est inférieure à la position minimale d_{min} , le potentiel est très raide et les interactions répulsives u_{el} et u_{sd} prédominent. Pour la partie asymétrique $d > d_{min}$, la distance entre particules est plus grande que la portée des interactions répulsives, l’interaction magnétique l’emporte et $u(d) \simeq u_m(d)$. L’asymétrie est d’autant prononcée que λ est petit et kT grand. À cause de cette asymétrie plus ou moins prononcée du potentiel, la distance moyenne $\langle d \rangle$ explorée par la particule représentée par un point noir sur la figure 6.8 est supérieure à d_{min} . Pour des champs faibles, la chaîne va se dilater thermiquement.

Le potentiel est défini par

$$u(d) = \int_{d_{min}}^{\infty} d \cdot p(d) dd \quad (6.11)$$

avec une probabilité $p(d)$ qui suit une loi de Boltzman. La distance moyenne $\langle d \rangle$ devient

$$\langle d \rangle = \frac{\int_{d_{min}} \exp^{-\beta u(d)} d \cdot dd}{\int_{d_{min}} \exp^{-\beta u(d)} \cdot dd} \quad (6.12)$$

Pour de faibles températures et donc pour de petits déplacements, l'anharmonicité est peu marquée et peut être traitée comme une perturbation. Le potentiel est donc classiquement modélisé par

$$v(x) = k \frac{x^2}{2} + gx^3 + wx^4 \quad (6.13)$$

où x représente le déplacement de la particule dans le potentiel et son excursion au delà de d_{min} tel que $x = d - d_{min}$. Les termes k , g et w sont des dérivées de $u(d)$ et dépendent de κ , d , λ ... Selon le calcul complet de l'équation 6.12 et les termes perturbatifs de $v(x)$ (Stern *et al.*, 1991), l'expression de $\langle x \rangle$ en fonction de kT est donnée par la relation

$$\langle x \rangle = -\frac{3gk_B T}{k^2} \quad \text{et} \quad \langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k} \quad (6.14)$$

et on retrouve bien la même expression que celle obtenue avec le théorème de l'équipartition

$$\langle (x - \langle x \rangle)^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{k} \quad (6.15)$$

L'analyse de Monte-Carlo sur deux particules voisines interagissant avec un potentiel $u(d)$ donne accès à $\langle d \rangle$ et à $\langle x \rangle$. Elle donne le même résultat que les équations (6.12) et (6.14). Le graphique A de la figure 6.9 représente la force $f(\langle d \rangle)$ en fonction de $\langle d \rangle - 2R$ pour différentes températures et permet de valider la mesure. L'expansion thermique contribue à une excursion $\langle x \rangle$ plus grande de la particule dans le potentiel représenté dans l'encart de la figure A. Pour $T = 0K$, le profil force-distance est linéaire et traduit l'équilibre entre les forces électrostatiques et les forces magnétiques. Pour des températures $T > 0$, l'effet de l'agitation thermique est important pour les faibles forces et les courbes s'écartent

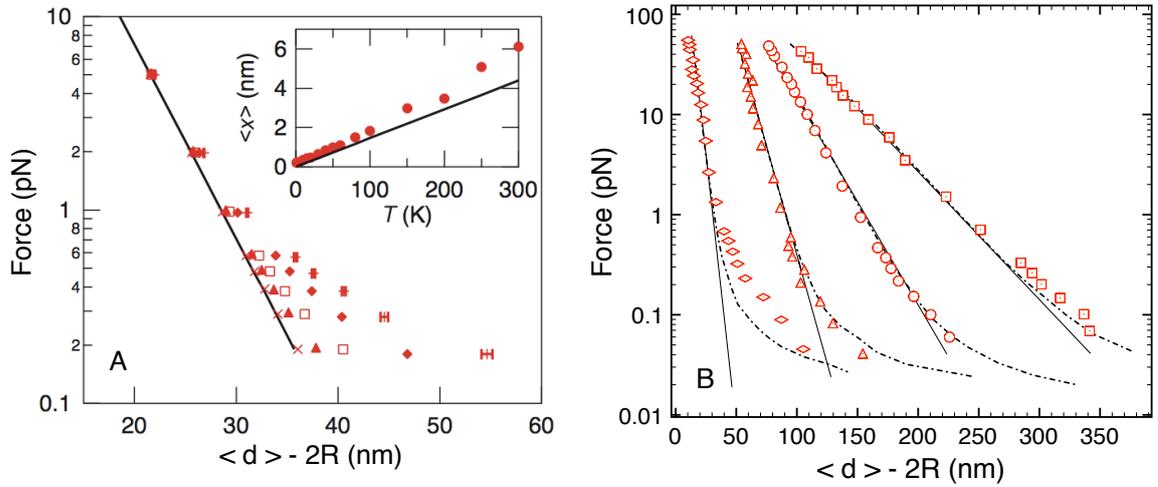


FIG. 6.9 – **A.** Simulation de la force en fonction de $\langle d \rangle - 2R$ pour différentes températures. De gauche à droite : $T = 10K, 50K, 100K, 200K$ et $300K$, et la ligne pleine pour $T = 0K$. **Encart.** Simulation de $\langle x \rangle$ en fonction de la température. Les symboles \bullet correspondent à $\lambda = 50$, et la ligne solide représente l'approximation de l'équation (6.15). **B.** Superposition des profils expérimentaux avec la simulation de Monte-Carlo. Force en fonction de $\langle d \rangle - 2R$ pour différentes forces ioniques : \square $c = 0,07mM, \kappa^{-1} = 34$ nm ; \circ $c = 0,25mM, \kappa^{-1} = 19$ nm ; \triangle $c = 1mM, \kappa^{-1} = 10$ nm ; \diamond $c = 5mM, \kappa^{-1} = 4$ nm. L'ajustement de Monte-Carlo est représenté en pointillé.

du régime linéaire.

Regardons à présent, l'effet de la dilatation thermique, sur la mesure de force. Dans la même approximation que pour l'expérience (Eq 6.2), on a

$$f(\langle d \rangle) = \left. \frac{du_m(d)}{dd} \right|_{d=d_{min}} \quad (6.16)$$

Dans les conditions de salinité semblables à l'expérience, les profils électrostatiques ainsi simulés ajustent les données expérimentales.

Pour des interactions magnétiques faibles, correspondant à un potentiel asymétrique et un λ petit, l'équilibre mécanique du système est bouleversé par des perturbations thermiques. Ces fluctuations thermiques dilate le système et conduisent à une augmentation de $\langle d \rangle$ et explique l'origine de la déviation.

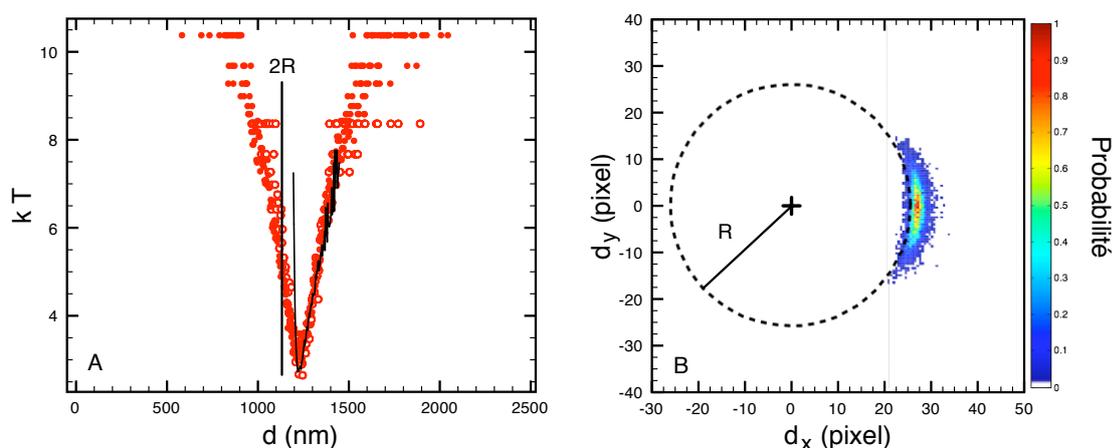


FIG. 6.10 – À gauche. Potentiel d’interaction de deux particules À droite. Distribution normalisée en d_x et d_y . On regarde comment la particule évolue dans le référentiel de sa voisine. La particule voisine est symbolisée par la croix au point de coordonnées $(0,0)$.

6.3.8 Valeur absolue de la force

Comme nous l’avons évoqué dans la partie 6.3.5, pour connaître la force magnétique, il faut déterminer expérimentalement la susceptibilité magnétique des particules et la valeur obtenue n’est pas absolue.

La forme du potentiel d’interaction représentée en figure 6.8 est caractéristique de l’interaction magnétique entre deux particules et des propriétés magnétiques intrinsèques du dipôle. La forme du potentiel obtenu expérimentalement doit permettre de remonter de manière absolue à la force magnétique qui n’est pour le moment accessible que par la mesure de la susceptibilité magnétique.

Pour déterminer expérimentalement la forme du potentiel d’interaction, on réalise une statistique importante ($\simeq 15000$ points) sur la distance d d’une particule avec sa voisine de gauche. C’est à dire que l’on regarde comment la particule évolue dans le référentiel de sa voisine. Pour s’affranchir de la polydispersité des particules et des effets de bords, on ne considère que deux particules situées au milieu d’une chaîne. On se place dans un régime où l’on est le plus sensible aux interactions magnétiques, c’est à dire dans un régime où le désordre

thermique est grand et pour un champ magnétique faible à la limite de la destruction de la chaîne soit $B = 0,8$ mT équivalent à $\lambda = 15$.

Le potentiel d'interaction et les distributions normalisées en d_x et en d_y sont reportés sur la figure 6.10. Le potentiel d'interaction (graphique A) en trait noir donné par l'équation (6.8) ajuste parfaitement la partie droite du potentiel (symbole ●) où les interactions magnétiques prédominent. Cependant le potentiel obtenu n'est pas asymétrique et la particule explore des distance inférieures à son diamètre $2R$. Pour le potentiel ○, les valeurs anormalement trop faibles ont été enlevées. Ceci permet de reserrer la partie électrostatique.

Les distributions normalisées du graphique B de la figure 6.10 caractérisent la probabilité de trouver la particule dans le plan (x,y) . La forme ainsi dessinée ressemble à un croissant. Cette zone correspond à l'espace exploré par la particule de rayon R . Cette forme s'organise autour de la particule voisine. Le cercle en pointillé de rayon $2R$ représente la limite d'interpénétration des deux particules. Bien que ce cercle ajuste la zone interne du croissant, quelques points sont à l'intérieur du cerle.

L'exploration de la particule aux distances $d < 2R$ pourrait se justifier par l'incertitude sur R liée à la polydispersité des particules, mais l'analyse des autres particules de la chaîne confirme ces résultats. Une autre explication est avancée mettant en évidence un « glissement » d'une des particules dans l'axe z de la même manière que le déplacement en y . Cette situation un peu particulière a été identifiée sur la photo A de la figure 6.11. On considère les trois particules au milieu de la chaîne, numérotées 1, 2 et 3. Analytiquement, les composantes d_x et d_y de la particule 2 sont anormalement plus faibles. Visuellement, l'excursion de la particule dans l'axe z se repère par la taille de sa tâche de diffraction plus petite que sa voisine de gauche. Celle-ci passe à l'arrière de cette dernière conduisant à une tâche plus petite. En effet, le rayon de la tâche dépend de la distance de la bille au plan focal de l'objectif et la tâche de diffraction constitue une empreinte caractéristique de la position en z de

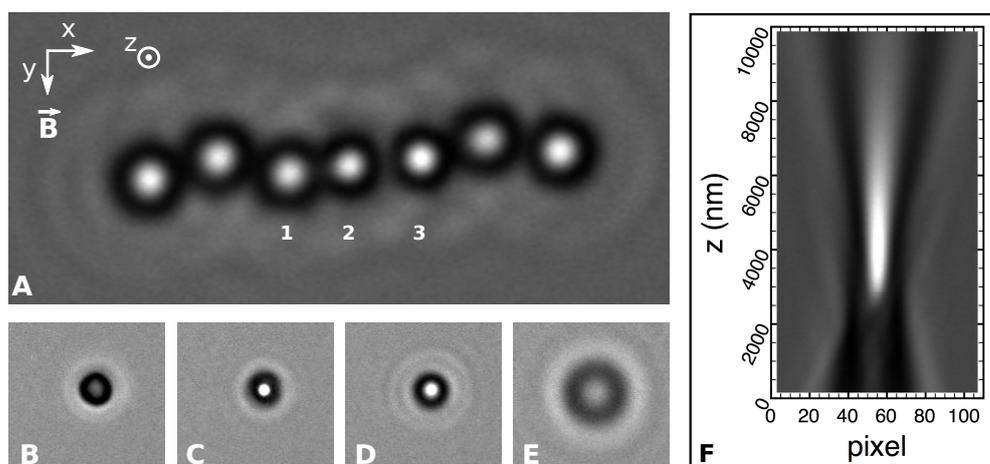


FIG. 6.11 – **A.** Chaîne pour un champ magnétique appliqué est égale à 0,8 mT et une force ionique à 5 mM : le désordre thermique est favorisée. **B,C,D et E.** Images d’une particule immobilisée observée dans différents plans z . **F.** Image de calibration construite par empilement de coupes radiales d’une particule immobilisée pour plusieurs positions z de l’objectif.

la particule.

Pour mesurer le déplacement de la particule sur l’axe z , il est possible d’utiliser l’évolution de la tâche de diffraction de la particule selon z (Gosse et Croquette, 2002). Le principe consiste en la construction d’une image de calibration (F-FIG 6.11) constituée de différentes tranches d’images prises dans différents plans z (B,C,D et E). Cette image résulte de la construction de 160 profils radiaux avec un pas de 50 nm. Cette image de calibration est ensuite corrélée avec l’image à traiter. Pour tester l’efficacité de la méthode, l’image calibrée est corrélée avec les images qui ont servi à la créer. Les résultats montrent que la résolution du pas de la calibration limite actuellement la méthode.

La partie magnétique du potentiel simulée ajuste le potentiel expérimental et on retrouve la valeur de λ correspondante. Des études sont cependant en cours pour comprendre la forme symétrique du potentiel.

Conclusion

Ce chapitre nous a permis de dresser les différentes caractéristiques de la machine de force que nous avons développée. La résolution temporelle fixée à 3 s va nous permettre de suivre l'évolution de la distance centre à centre des particules qui augmente sous l'effet de la polymérisation de l'actine. La résolution de la mesure sur la distance est estimée à 10 nm, avec un biais de 20 nm dû à la polydispersité des particules. Les forces comprises entre 0, 1 et 100 pN vont nous permettre d'étudier une population de quelques filaments d'actine greffés à la surface des particules.

Troisième partie

Application aux filaments d'actine

Introduction

L'étude proposée utilise la machine de force pour sonder les forces générées par la polymérisation des filaments d'actine. Pour initier la polymérisation sur les particules magnétiques, celles-ci sont fonctionnalisées avec une protéine « liant » l'actine, la gelsoline. Lorsque l'on applique un champ magnétique, les particules s'organisent sous forme de chaîne et une force attractive dipolaire est induite entre chaque particule. Cette contrainte va nous permettre de sonder les mécanismes à l'origine de la production de la force. Nous détaillons l'évolution de la distance centre à centre des particules sous l'effet de la polymérisation et nous analysons les propriétés mécaniques des filaments en regardant la réponse mécanique du système sous l'effet de la force magnétique appliquée.

Cette partie s'organise en deux chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons le système biologique construit à la surface des particules. Puis dans le deuxième, nous exposons l'ensemble des résultats et des interprétations relatives à l'étude.

Description du système pour la mesure de force

7.1 La gelsoline comme protéine nucléatrice

7.1.1 Fonctionnalisation des particules magnétiques

Pour localiser la polymérisation des filaments d'actine sur la surface des colloïdes, on utilise une *Actin Binding Protein*, la gelsoline. Découverte en 1979 par Yin et Stossel (1979), elle est constituée de 6 domaines d'environ 125 acides aminés chacun (Burtnick *et al.*, 1997). Dans sa forme compacte et fermée, elle est inactive et dans cette conformation, elle ne peut s'associer à l'actine. C'est la liaison du calcium sur des sites calciques spécifiques de la protéine qui permet son ouverture, rendant ainsi ses domaines accessibles à l'actine (Coué et Korn, 1985). Cette protéine appartient aux ABP de coiffe puisqu'elle *cappe* les filaments à leur extrémité barbée. La gelsoline possède également des propriétés de nucléation. En solution, elle forme un complexe avec deux monomères d'actine, appelé GA_2 . Ce complexe initie la polymérisation des filaments en solution qui polymérisent par leur extrémité pointue.

Cette propriété va nous permettre d'initier la polymérisation des filaments sur la surface des colloïdes.

La vitesse de polymérisation à cette extrémité est relativement lente et expérimentalement non contraignante.

Plusieurs approches ont été tentées pour immobiliser la protéine sur les particules magnétiques. Pour chacune d'entre elles, des dosages sur gel de polyacrylamide couplés à des études par spectrométrie de fluorescence permettent de comparer la quantité de protéine présente sur les billes et la quantité de protéine active.

L'adsorption non-spécifique est la méthode la plus simple puisqu'elle ne demande aucune réaction physico-chimique. Elle met en jeu des interactions électrostatiques et hydrophobes entre la protéine et les fonctions carboxyliques des particules. Malheureusement, cette liaison faible n'assure pas un lien suffisamment solide entre le filament sous contrainte et la particule ; les filaments se décrochent en solution.

Il est possible de créer une liaison peptidique entre les groupements carboxyliques des billes avec les sites NH_2 de la protéine en présence d'EDC (1-Ethyl-3- [3-Diméthylaminopropyl] Carbodiimide hydrochloride) et de sulfo-NHS (N-HydroxysulfoSuccinimide). Les résultats ont montré que la gelsoline est bien présente à la surface des particules mais que cette dernière n'est plus active.

La dernière méthode que nous avons testée et qui a été retenue, utilise l'interaction des streptavidines greffées à la surface des particules et des biotines préalablement greffées à la gelsoline. Les particules utilisées sont des Dynabeads MyOne Dynal-Invitrogen commerciales et fonctionnalisées avec des streptavidines. La biotinylation de la gelsoline est réalisée avant chaque expérience en faisant réagir une sulfo-NHS-biotine (Pierce Thermo Scientific Réf 21217) sur les sites NH_2 de la protéine. Nous avons optimisé le protocole de biotinylation pour conserver l'activité de la gelsoline et greffé environ 16 biotines sur la gelsoline. Le cou-

plage streptavidine-biotine assure un lien suffisamment solide pour résister à la contrainte. Les résultats montrent que le nombre de protéines présentes à la surface des particules et celles actives sont identiques. Chaque protéine active initie un filament et le nombre de filaments qui polymérisent à la surface de la particule est égal aux nombres de protéines actives. Les cinétiques de la gelsoline seule ou du complexe GA_2 sont identiques : le temps de nucléation des filaments dans les deux cas est donc le même et la longueur des filaments à la surface des particules est donc relativement homogène.

7.1.2 Optimisation du système

Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie 6.3.4, il est impératif de réduire la présence d'agrégats dans la chaîne. Dans notre système, plusieurs paramètres déstabilisent notre suspension colloïdale. D'abord, la fonctionnalisation des particules avec la gelsoline perturbe l'équilibre des forces attractives et répulsives. De plus, les conditions de polymérisation de l'actine nécessitent des concentrations en sels de l'ordre de 50 mM. À ces concentrations, les charges de surface qui maintiennent habituellement les particules en suspension sont écrantées, et les particules s'agrègent. De plus, la présence d'ions divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} nécessaires à l'activité de la gelsoline et de l'actine respectivement favorisent l'adsorption non spécifique de l'actine à la surface des particules. Ceci peut biaiser la concentration de l'actine en solution et créer des points de départ à des nouveaux filaments sur les particules. Pour assurer la stabilité des particules magnétiques, les conditions salines du milieu de polymérisation ont été optimisées et les concentrations des sels réduites. Dans ces nouvelles conditions, la constante d'association et la concentration critique de l'extrémité pointue ont été mesurées. L'ensemble de ces paramètres est reporté dans le tableau 7.1. La gelsoline et l'actine sont fournies par Marie-France Carlier et préparées par Dominique Didry.

Pour des concentrations en actine supérieures à $2,5 \mu M$, sa nucléation spontanée en solution

Conditions expérimentales		
	Actine	2 μM
Tampon G	Tris pH 7,8	5 mM
	CaCl ₂	0,2 mM
	ATP	0,2 mM
	DTT	1 mM
	F127	0,5%
	NaN ₃	0,01%
	Activation de la polymérisation	KCl
	Mg	0,6 mM
Constantes cinétiques		
Bout pointu	k_{on}	0,12 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ soit 0,42 nm.s ⁻¹
	C_c	0,7 μM
	k_{off}	0,084 s ⁻¹
Bout barbé	C_c	0,3 μM

TAB. 7.1 – Conditions expérimentales et constantes cinétiques.

puis sa polymérisation par l'extrémité barbée sont favorisées. Pour éviter la consommation de monomère d'actine par des filaments en solution, la concentration de l'actine a été fixée à 2 μM .

Finalement dans ces conditions, la vitesse de polymérisation du bout pointu donnée par la relation (4.12) est égale à 0,42 nm.s⁻¹. De même, la valeur maximale de la *stalling* force pour un filament selon l'équation (4.10) est égale à 1,5 pN.

7.2 Mesure des forces associées à la polymérisation

Une fois les particules fonctionnalisées avec la gelsoline, l'actine est ajoutée à la suspension colloïdale et la polymérisation est déclenchée. La solution ainsi préparée est injectée par capillarité dans le microtube puis scellée à une lame. L'échantillon est placé sur le microscope entre les deux bobines. Un champ magnétique de faible intensité est appliqué et initie la formation de chaînes. La zone d'observation contient la chaîne à étudier. Le début de la mesure commence au lancement du programme et il s'écoule entre 3 et 10 minutes, entre le moment où l'actine est injectée et la première image capturée. Ce temps est nécessaire à

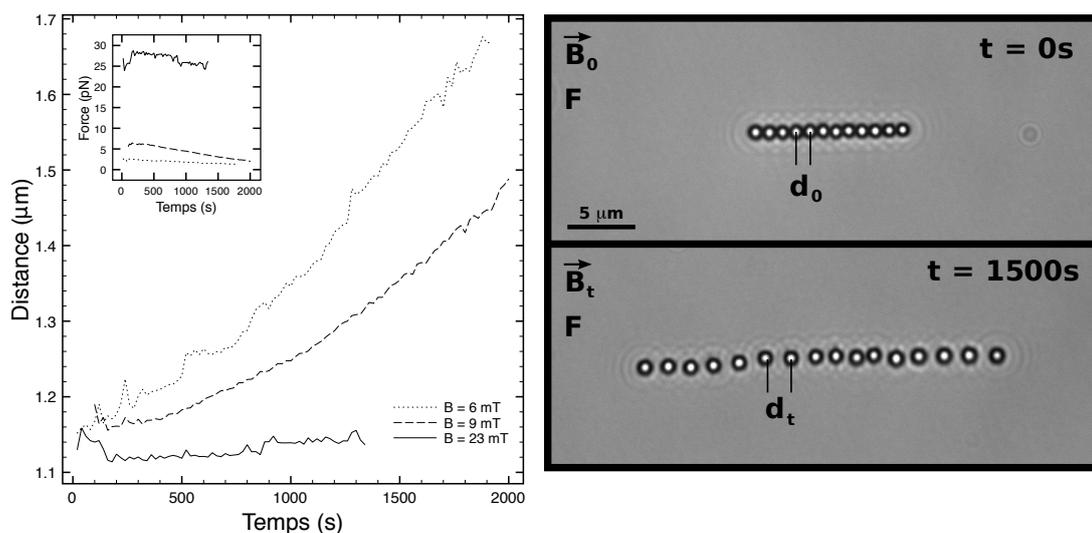


FIG. 7.1 — À gauche. Non linéarité des courbes distance-temps pour une force non constante. Encart : évolution de la force en fonction du temps. À droite. Principe de la mesure à force constante.

la préparation de l'échantillon et à la sélection de la chaîne de particules magnétiques. La première image capturée correspond à l'image à $t = 0$ s de la figure 7.1. Les particules sont au contact et la distance est d_0 . À $t = 1500$ s, l'actine qui a polymérisé à la surface des particules, a écarté les billes d'une distance d_t . Les courbes obtenues montrent que les particules s'écartent d'autant plus vite que la contrainte diminue et l'allure des courbes est cohérente avec les valeurs des forces appliquées. Ce résultat valide à la fois les conditions biochimiques et physico-chimiques choisies et la mesure de force.

La force magnétique relative à la distance séparant les particules est calculée selon la relation 5.7. Au fur et à mesure que d augmente (FIG 7.1), la force magnétique proportionnelle à B_0^2/d^4 diminue. L'ajustement des courbes présentées conduit à une dérivation très bruitée et ne permet pas de remonter précisément au profil force-vitesse. S'il avait été possible de traiter les courbes, cette méthode aurait été très avantageuse puisque toute l'information force-vitesse est contenue dans un seul profil distance-temps.

Pour simplifier la forme des courbes distance-temps, la force est maintenue constante grâce à une correction sur le champ magnétique (FIG 7.1). Lorsque la première image est enregistrée

trée et analysée, la force F est calculée. Puis, à chaque nouvelle image prise au temps t , la correction sur le champ magnétique B_t est donnée par

$$B_t^2 = F \cdot d_t^4 \quad (7.1)$$

Selon B_t , une nouvelle intensité est calculée et envoyée à l'alimentation des bobines. La vitesse de polymérisation de l'actine dans nos conditions est suffisamment faible pour réaliser cette rétroaction en temps réel (TAB 7.1). Comme nous le verrons dans la partie suivante, la correction en champ magnétique permet d'avoir des courbes distance-temps linéaires.

Force générée par la polymérisation de l'actine et propriétés mécaniques des filaments

8.1 Résultats cinétiques

8.1.1 Courbes distance-temps

La régulation en champ magnétique permet à présent de réaliser les mesures à force constante. La vitesse de polymérisation est lente et correspond à l'insertion de 1/10 de monomère par seconde. Une correction toutes les 15 s à chaque capture d'images est suffisante.

Les courbes distance-temps sont obtenues à partir du traitement des images de la figure 8.1 et les résultats obtenus sont représentés sur la figure 8.2. Chaque droite correspond à l'analyse d'une chaîne différente. Le temps $t = 0$ correspond au moment où la première image est enregistrée puis traitée et il s'est déjà écoulé entre 3 et 10 minutes entre le moment où la polymérisation a été déclenchée et la première image capturée.

Les courbes obtenues sont linéaires et aucun changement de régime n'apparaît sur une

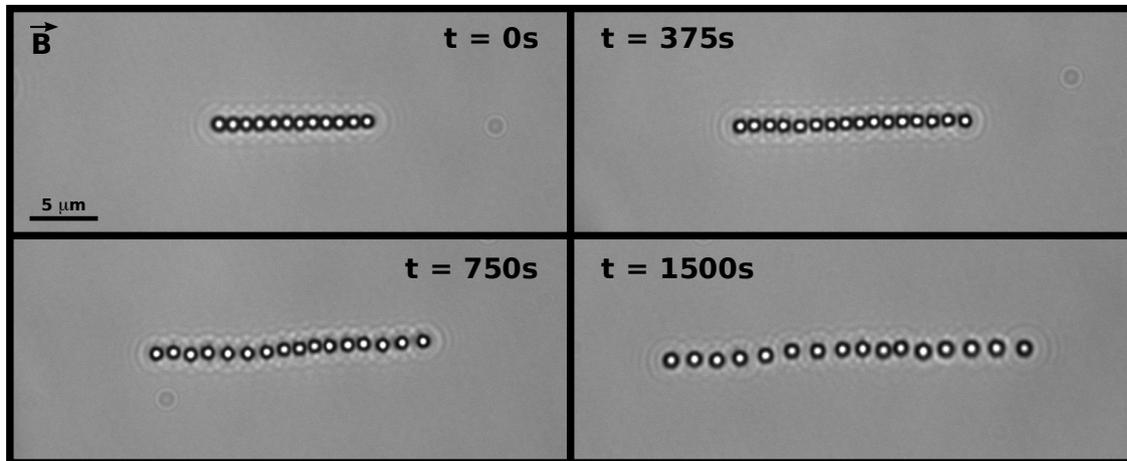


FIG. 8.1 – Évolution de la distance inter-particules en fonction du temps.

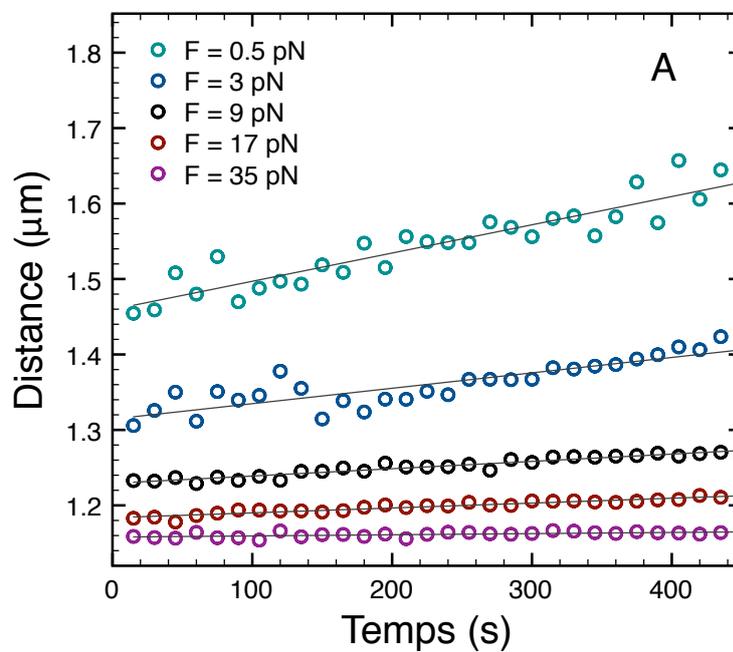


FIG. 8.2 – Profils distance-temps à force constante pour différentes forces pour $N_{GS} = 10000$.

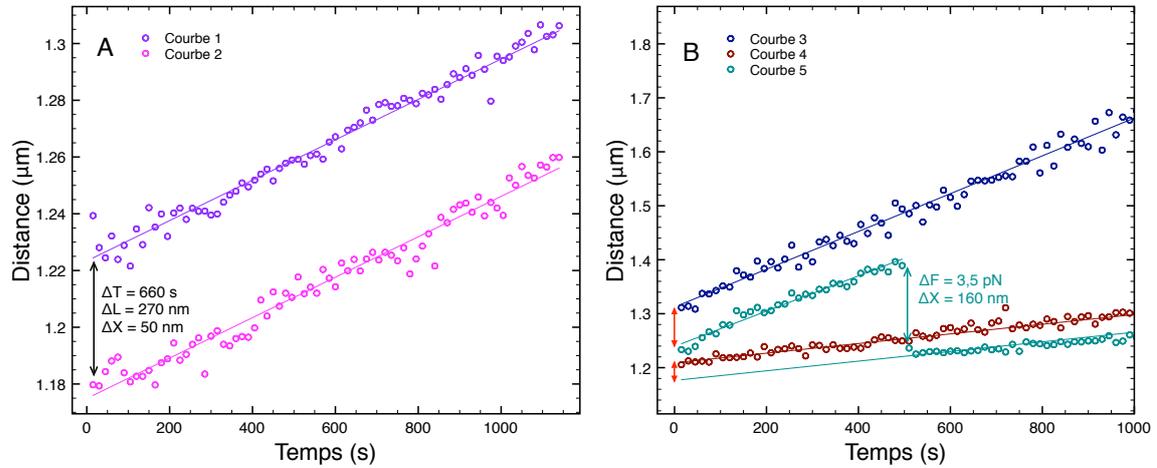


FIG. 8.3 — A. Courbes $d = f(t)$ pour $F = 7$ pN. Les deux mesures sont réalisées pour des longueurs différentes d'environ 270 nm. $N_{GS} = 10000$ B. Mesures pour deux contraintes successives ($F_1 = 0,50$ pN et $F_2 = 4$) sur une même chaîne (Courbe 5). Les courbes 3 et 4 sont les courbes témoins. $N_{GS} = 4000$.

échelle de 1000 s.

La pente des courbes varie avec la force et plus la contrainte appliquée est importante, plus la distance séparant les particules évolue lentement. Pour $F = 35$ pN, la distance reste constante.

Plus d'une centaine de profils distance-temps ont été réalisés pour tester la reproductibilité des mesures et sur des lots différents de particules greffées. Les expériences ont été réalisées avec de l'actine fraîchement préparée et sur des particules greffées le jour même de la mesure. Les courbes distance-temps enregistrées ont un profil qui dépend bien de l'intensité de la force appliquée et sont systématiquement linéaires.

À $t = 0$ s, le départ en distance de chaque courbe est différent. Ce décalage est fixé d'une part par la contrainte appliquée : plus la force est importante et plus les filaments sont comprimés d'où un départ plus ou moins haut à $t = 0$ s. D'autre part, ce décalage est aussi fixé par la longueur des filaments comme le montre le graphique A de la figure 8.3. Pour la courbe 1, les particules magnétiques ont polymérisé volontairement plus longtemps en absence de champ magnétique que la courbe 2, environ 650 s. Ce temps correspond à une différence dans les longueurs de filaments $\Delta L = 270$ nm, entraînant un décalage ΔX à $t = 0$ s de 50 nm où X est

la distance entre surface. Bien que les longueurs de filaments soient très différentes pour les deux courbes, la vitesse enregistrée est la même puisque les deux droites sont parallèles. La vitesse mesurée ne dépend pas de la longueur des filaments.

Le graphique B de la figure 8.3 propose d'appliquer deux contraintes successives sur une même chaîne. On effectue d'abord deux références représentées par les courbes 3 et 4 pour $F_1 = 0,50$ pN et $F_2 = 4$ pN respectivement. Puis sur une nouvelle chaîne, on applique d'abord la force F_1 faible puis la force F_2 plus importante. Le passage d'une force à l'autre impose une compression en distance de 160 nm soit une compression d'environ 60% du système. Bien que le système soit fortement comprimé, la vitesse de polymérisation sous la force F_2 est équivalente à la référence (courbe 4). La vitesse mesurée ne dépend pas de l'histoire de la force appliquée.

On note un décalage entre les deux références et la courbe 5 représenté par les deux flèches rouges. Ce décalage peut être provoqué par des différences dans les longueurs de filaments, au même titre que le graphique A, ou bien par la polydispersité des particules (Partie 6.3.5). Pour résumer, les courbes distance-temps enregistrées sont donc systématiquement linéaires et aucun changement de régime ou de variation n'est enregistré. La vitesse de polymérisation ne varie pas avec la longueur des filaments et ne dépend pas de l'histoire de la force appliquée.

8.1.2 Profil force-vitesse

Le profil force-vitesse représenté sur la figure 8.4 est obtenu à partir des courbes $d = f(t)$. Chaque courbe est ajustée linéairement et on en déduit la vitesse d'écartement des particules en fonction de la force appliquée. Chaque ajustement donne un point sur le profil force-vitesse qui est ainsi reconstruit. Le profil obtenu montre que la vitesse de polymérisation décroît avec la force jusqu'à la valeur critique estimée ici à 35 pN que l'on peut associer à la

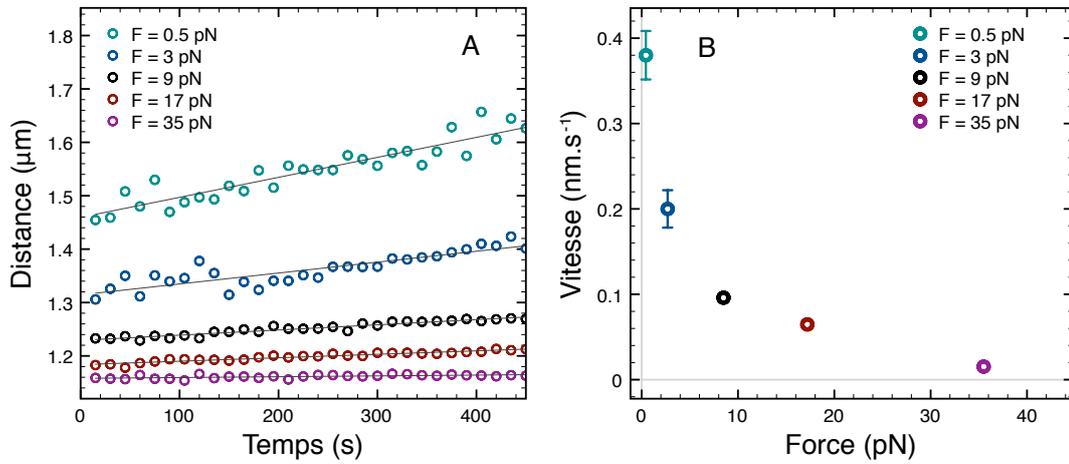


FIG. 8.4 – **À gauche.** Profil distance-temps à force constante pour différentes forces pour 10000 gelsolines actives par billes. **À droite.** Profil force-vitesse obtenu par ajustement linéaire des courbes $d = f(t)$.

stalling force. La vitesse obtenue pour une force très faible mais suffisante pour maintenir la chaîne, correspond à la vitesse mesurée en solution soit $0,42 \text{ nm.s}^{-1}$ ce qui valide notre méthode. Ce résultat confirme l'interpénétration des filaments entre eux. En effet, si l'extrémité de chaque « brosse » de filaments avait été au contact de l'autre brosse, la distance mesurée n'aurait pas été L mais $2L$ entraînant une erreur d'un facteur 2 sur la vitesse.

Pour mettre en évidence des effets collectifs dans la génération de la force, on varie le nombre de filaments dans la zone de contact entre les deux particules. Pour cela, il suffit de modifier la densité de gelsoline par unité de surface. Les profils présentés sur la figure 8.5 ont été réalisés pour 2000, 4000 et 10000 gelsolines actives sur la surface des particules. Ce nombre est obtenu par dosage des billes fonctionnalisées en spectrométrie de fluorescence (Annexe B.1.3). Pour rester dans un système interpénétré, le nombre de gelsolines greffées n'excèdent pas la monocouche soit environ 100000 protéines par particule.

Pour $F \leq 4 \text{ pN}$, les profils ne montrent pas de vraies différences. Au delà de 4 pN, le comportement diffère selon les trois densités et se décale vers les grandes forces et la valeur de la force critique est différente pour les trois profils. On trouve $F_{stall} = 13, 35 \text{ et } 40 \text{ pN}$. La *stalling force* pour un filament a été estimée dans nos conditions à 1,5 pN. Le nombre de fi-

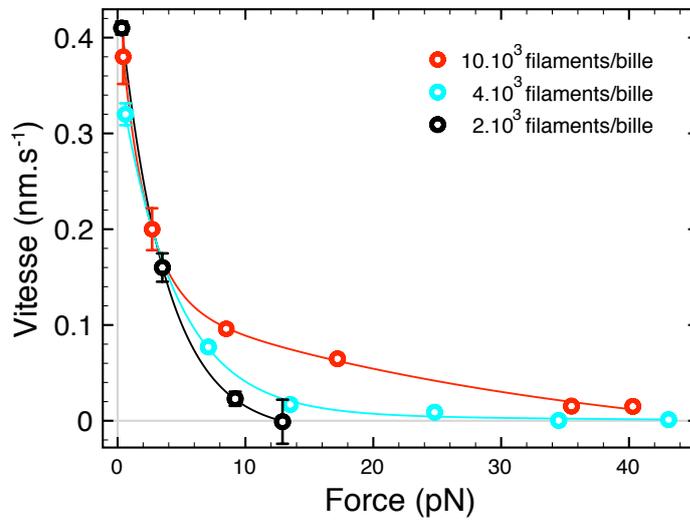


FIG. 8.5 – Profils force-vitesse pour $N_{GS} = 2000, 4000$ et 10000 gelsolines par bille.

laments sondé dans la zone de contact est donc estimé à 8, 23 et 27 pour 2000, 4000 et 10000 filaments par particules respectivement. De plus, aucune vitesse négative n'a été enregistré et aucun phénomène de dépolymérisation n'a été donc mis en évidence.

Pour résumer, les courbes distance-temps obtenues pour différentes contraintes varient avec l'intensité de la force appliquée. Les courbes obtenues sont systématiquement linéaires et ne dépendent pas de la longueur des filaments. Les profils force-vitesse obtenus varient avec le nombre de filament dans la zone de contact entre les deux particules.

8.2 Propriétés mécaniques et élastiques des filaments recrutés

8.2.1 Réponse mécanique du système

Pour sonder les propriétés mécaniques des filaments d'actine à la surface des particules, on enregistre un profil force-distance pour différentes longueurs de filaments. Cette mesure consiste à appliquer une gamme de force comprise entre 0, 1 pN et 50 pN. L'enregistrement d'un seul profil ne dure que quelques secondes et on considère que la longueur des fila-

8.2. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS RECRUTÉS

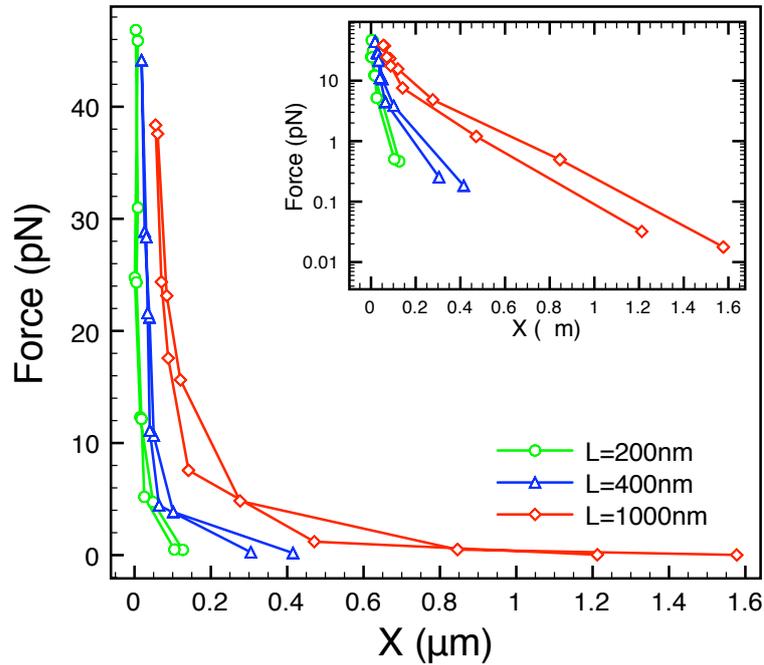


FIG. 8.6 – Profil force-distance pour $L = 200, 400$ et 1000 nm. Dans l'encart, la force est en échelle logarithmique.

ments reste constante pendant la mesure. Les courbes sont réalisées sur la même chaîne de particules.

Le premier profil est enregistré 8 minutes après le déclenchement de la polymérisation de l'actine. Selon la vitesse de polymérisation de l'actine dans nos conditions, la longueur des filaments est estimée à 200 nm (Courbe verte de la figure 8.6). Une fois le profil réalisé, un champ magnétique faible conserve l'assemblage en chaîne. Ce champ magnétique est suffisamment faible pour maintenir la vitesse de polymérisation des filaments à la vitesse de polymérisation en solution. Un second profil est enregistré pour $L = 400$ puis un troisième pour $L = 1000$ nm, représentés par les courbes bleue et rouge respectivement. Comme nous le constatons, à force magnétique constante, la réponse mécanique enregistrée dépend de la longueur des filaments.

Chaque profil est composé de deux branches : une première branche de montée en force et une deuxième pour la descente. Les deux branches sont équivalentes et la mesure est consi-

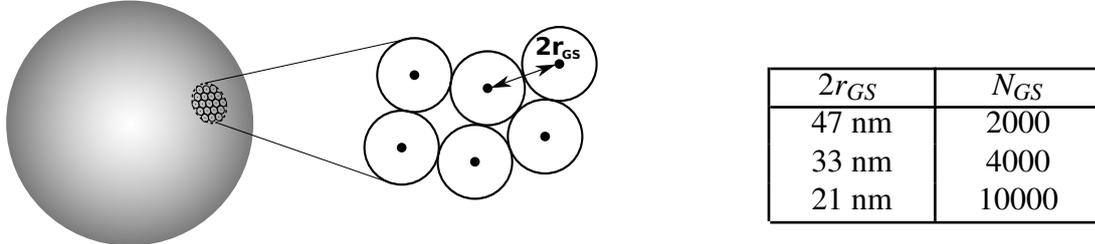


FIG. 8.7 – Empilement aléatoire compact et distance moyenne $2r_{GS}$ pour différentes densités de gelsolines.

dérée comme réversible ; excepté pour les faibles forces où les particules sont très éloignées les unes des autres ($\simeq 1,2 \mu\text{m}$) et les fluctuations thermiques augmentent l'erreur sur la distance.

Afin de comprendre l'origine de la force mécanique du système, commençons par analyser l'effet de la force sur le nombre de filaments recrutés dans la zone de contact.

8.2.2 Géométrie du système

Pour comprendre comment le recrutement de filament se fait à la surface des particules, nous proposons la description géométrique suivante du système.

8.2.2.1 Distance moyenne entre filament

Définissons d'abord la distance moyenne séparant chaque filament à la surface des particules de rayon R . Ces dernières sont recouvertes d'un nombre N_{GS} de gelsoline. Pour estimer la distance moyenne $2r_{GS}$ séparant chaque protéine, il faut rapporter la surface occupée par les protéines à la surface de la bille pour un empilement aléatoire compact ϕ (*Random Close Packing, RCP*) (FIG 8.7) tel que

$$\phi = \frac{N_{GS}\pi r_{GS}^2}{4\pi R^2} = 0.85 \quad \text{soit} \quad 2r_{GS} = 4R \sqrt{\frac{\phi}{N_{GS}}} \quad (8.1)$$

8.2. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS RECRUTÉS

Pour un empilement aléatoire de sphères à deux dimensions, on prend ϕ égal à 0.85. Avec R égal à 1140 nm, les distances moyennes $2r_{GS}$ sont données dans le tableau de la figure 8.7 en fonction de différentes densités N_{GS} .

8.2.2.2 Nombre de filaments dans le contact

Maintenant que nous connaissons le nombre de gelsoline par unité de surface et donc le nombre de filaments, nous pouvons discuter du nombre de filament qui va être recruté dans la zone de contact entre deux particules.

Sur la figure 8.8, deux particules magnétiques sont schématisées. Les filaments de longueur L considérés comme ayant tous la même longueur forment une couronne autour de la particule. L'intersection du cercle de rayon $(R + L)$ avec la particule voisine est repérée par le point A de coordonnées (x_A, y_A) avec

$$\begin{cases} (R + L)^2 = x_A^2 + y_A^2 \\ R^2 = (d - x_A)^2 + y_A^2 \end{cases} \implies x_A = \frac{d}{2} + \frac{L(L + 2R)}{2d} \quad (8.2)$$

Le nombre de filaments de la couronne au contact avec la particule voisine est compris dans un cône d'angle solide Ω défini par

$$\Omega = 2\pi(1 - \cos \theta) \quad \text{et} \quad \cos \theta = \frac{x_A}{R + L} \quad (8.3)$$

Avec $d = 2R + X$, où X est la distance entre les deux surfaces des particules, l'angle θ est défini par la relation

$$\cos \theta = \frac{(2R + X)^2 + L(L + 2R)}{2(2R + X)(R + L)} \quad (8.4)$$

Le nombre de filaments N sur la surface S défini par le cône Ω est

$$N = \frac{N_{GS}S}{4\pi R^2} = \frac{N_{GS}}{2}(1 - \cos \theta) \quad (8.5)$$

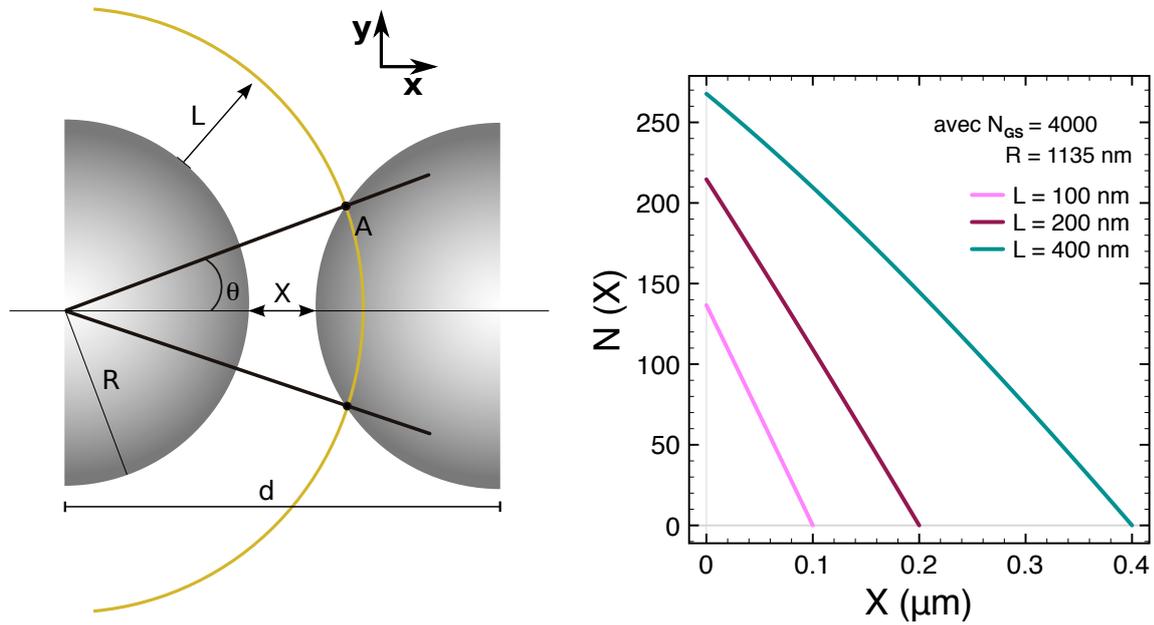


FIG. 8.8 – À gauche. Paramètres géométriques du système. À droite. Nombre de filaments $N(X)$ recrutés en fonction de la distance X et pour $L = 100, 200, 400$ nm pour $N_{GS} = 4000$.

En combinant les équations (8.22) et (8.5), on obtient une expression de N qui dépend de la longueur L des filaments, du nombre de gelsolines N_{GS} , du rayon R des particules et de la distance X entre les deux surfaces tel que

$$N = \frac{N_{GS}}{2} \left(1 - \frac{(2R + X)^2 + L(L + 2R)}{2(2R + X)(R + L)} \right) \quad (8.6)$$

L'évolution du nombre de filaments en fonction de X est décrite sur le graphique de la figure 8.8 pour différentes longueurs de filaments L . Au départ $X = L$ et $\theta = 0$: il n'y a pas d'intersection entre la couronne et la surface de la particule voisine. Puis, on rapproche les deux particules, X diminue et θ augmente : le cercle jaune pénètre la sphère grise. Selon l'équation (8.5), le nombre de filaments recrutés augmente avec θ jusqu'à ce que $X = 0$, les particules sont au contact.

Le nombre de filaments recrutés dans la zone entre les deux particules dépend à la fois de la longueur des filaments mais aussi de la distance X séparant les particules. Cette distance est,

8.2. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS RECRUTÉS

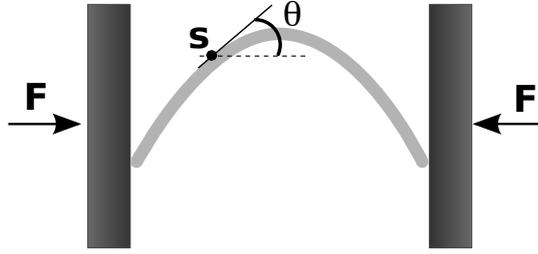


FIG. 8.9 – Filament comprimé à ces deux extrémités par une force F . s représente l'abscisse curviligne, θ l'angle entre l'axe horizontal et la tangente au filament.

dans l'expérience, fixée par la force. Pour un $X \simeq 100$ nm (Graphique B - FIG 8.3) et $L \simeq 200$ nm, une centaine de filaments sont présents dans la zone de contact.

Maintenant que l'organisation du système est mieux comprise, à présent on peut s'intéresser à l'origine de la force mécanique.

8.2.3 Énergie élastique du système

L'origine de la force mécanique du système peut provenir du flambement des filaments et il est raisonnable de comparer nos mesures aux forces de *buckling*.

Dans notre système, nous ne connaissons pas les conditions d'attachement des deux extrémités. Néanmoins, afin de justifier les compressions d'une centaine de nanomètres observées, nous pouvons considérer le cas d'un filament comprimé à ces deux extrémités, libres de pivoter (FIG 8.9).

Le système d'équations et ses conditions aux limites décrivent la position et l'orientation de ce filament sous compression tel que

$$\begin{aligned}
 \frac{d^2\theta}{ds^2} &= -\frac{F}{L_p k_B T} \sin \theta & \theta'(L=0) &= 0 \\
 \frac{dx}{ds} &= \cos \theta & \theta(L=L/2) &= 0 \\
 \frac{dz}{ds} &= \sin \theta & \theta'(L=L) &= 0
 \end{aligned}
 \tag{8.7}$$

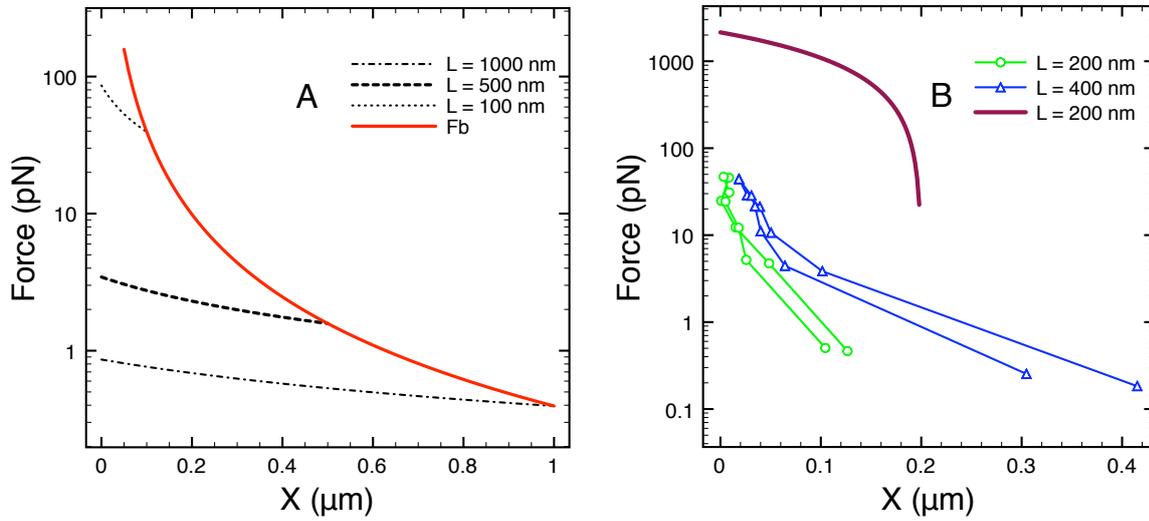


FIG. 8.10 – Évolution de la distance X séparant les deux extrémités du filament en fonction de la force de compression pour $L = 100, 400$ et 1000 nm.

La solution numérique obtenue permet de décrire le comportement élastique au-delà de la force critique d'Euler F_b égale à

$$F_b = \frac{\pi^2 k_B T \lambda_p}{L^2} \quad (8.8)$$

où λ_p est la longueur de persistance et L la longueur du filament. F_b est représenté par la courbe rouge sur le graphique A de la figure 8.10. Les courbes obtenues pour différentes longueurs de filaments sont également reportées. Dès que l'on passe au dessus de la force critique d'Euler, le filament flambe. Au-delà de F_b , la force nécessaire pour le comprimer encore n'évolue plus beaucoup. Pour $\lambda_p = 10 \mu\text{m}$ et $L = 200$ nm, la force f nécessaire pour flamber un seul filament est égale à 20 pN. Précédemment nous avons défini le nombre de filament $N(X, L, R)$ à N_{GS} donné (Eq (8.6)). Pour flamber cette population, les forces vont être $N(X, L, R)$ fois plus grandes que la force nécessaire pour flamber un seul filament. Sur le graphique B de la figure 8.10, les profils expérimentaux sont superposés à $f \times N(X, L, R)$. Le graphique montre que les forces mises en jeu dans notre système sont bien plus faibles que les forces de flambement.

8.2. PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES ET ÉLASTIQUES DES FILAMENTS RECRUTÉS

Pour expliquer les compressions de plus d'une centaine de nanomètres avec la force observée sur les courbes distance-temps (Graphique B - FIG 8.3), le lien entre le filament et la surface de la particule doit être suffisamment flexible pour laisser le filament libre de s'incliner à la base face à la compression. On peut considérer un couplage élastique sur l'ancrage mais décrivons d'abord le minimum d'énergie relatif à une force entropique.

8.2.4 Effet entropique

Considérons un filament attaché à sa base à une surface avec un lien suffisamment flexible pour laisser le filament libre de s'incliner face à la compression d'un second plan, comme l'illustre la figure 8.11. Les configurations accessibles par le filament après compression sont réduites et l'entropie du système est diminuée à cause du confinement.

La fonction de partition Z des configurations d'un filament comprimé au contact d'un plan à une distance X s'écrit

$$Z = \int_0^{2\pi} d\phi \int_{\theta_m}^{\pi/2} d\theta \sin \theta = 2\pi \cos \theta_m \quad (8.9)$$

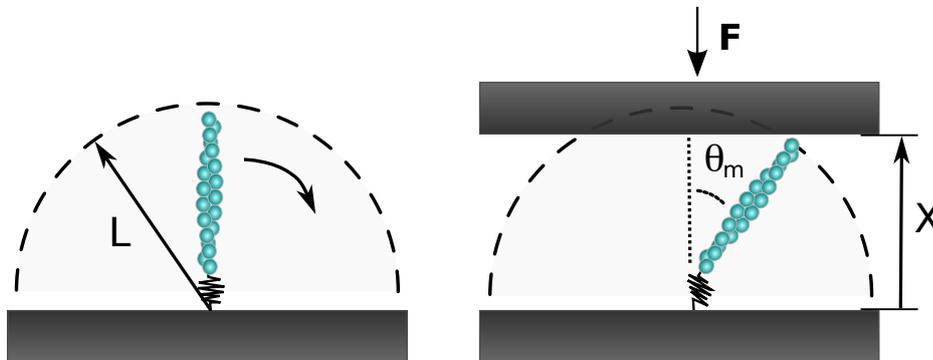


FIG. 8.11 – Compression d'un filament par un plan. X est la distance entre les deux surfaces et θ_m l'angle maximal pour lequel le filament est au contact du plan.

*CHAPITRE 8. FORCE GÉNÉRÉE PAR LA POLYMÉRISATION DE L'ACTINE ET
PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES FILAMENTS*

avec $\cos \theta_m = X/L$. L'énergie libre de Helmholtz \mathcal{F} est définie comme étant

$$\mathcal{F} = -k_B T \cdot \ln(Z) \quad (8.10)$$

La force entropique d'un filament $F_1 = -(\partial \mathcal{F} / \partial X)$ conduit à l'expression

$$F_1 = \frac{k_B T}{X} \quad (8.11)$$

Dans l'analyse géométrique proposée précédemment, un nouvel élément a été introduit et on considère un nombre de filaments $N(X, L, R)$ (Eq 8.6). Pour avoir le comportement entropique de N filaments confinés, on définit F_N tel que

$$F_N = F_1 \times N(X, L, R) \quad (8.12)$$

et finalement, on a l'expression de la force entropique suivante

$$F_N = \frac{k_B T}{X} \times N(X, L, R) \quad (8.13)$$

Les résultats sont reportés sur le graphique A de la figure 8.12 et comparés aux mesures mécaniques expérimentales sur le graphique B. Les courbes sont ajustées à un facteur près A tel que $F_N = A \frac{k_B T}{X} \times N(X, L, R)$ et égal à 0,2 pour $L = 200$, $A = 0,4$ pour $L = 400$ nm et 3 pour $L = 1000$ nm. La longueur des filaments est aussi ajustée et les simulations correspondent à $L = 200$ nm, $L = 500$ nm et $L = 1200$ nm.

Pour tenir compte de la géométrie de la sphère, l'analyse est plus compliquée et a été détaillée par Miller et Williams (2000). Un raisonnement plus complet améliorera la simulation mais dans une première approximation et pour la suite de l'analyse, l'équation (8.11) est suffisante.

Pour conclure, les forces mécaniques mesurées pour notre système sont bien plus faibles que l'intensité des forces de flambement. Les distances de compression pouvant atteindre 100

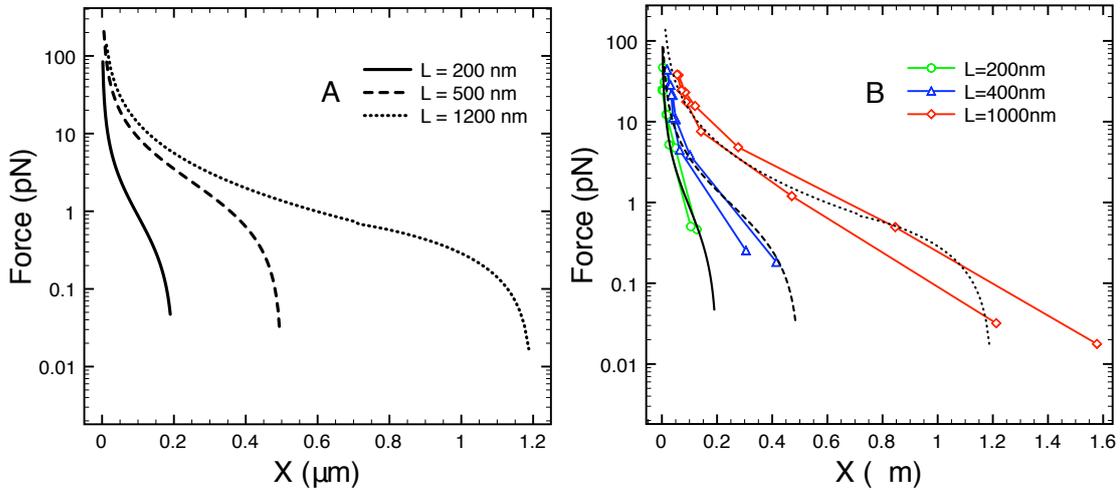


FIG. 8.12 – A. Forces entropiques pour N filaments. B. Comparaison avec les mesures mécaniques expérimentales.

nm, montrent que le lien qui relie le filament à la surface de la particule est très flexible. Pour un tel lien, lorsque les filaments sont comprimés, l'entropie du système diminue et selon l'équation (8.13), la force mécanique ne dépend que de X . Dans ce contexte, les forces mécaniques mesurées sont associées à des effets entropiques. Ces effets constituent le minimum d'énergie et ce minimum suffit à expliquer nos résultats.

8.3 Force associée à la polymérisation : nombre de filaments actifs

Maintenant que nous avons une meilleure description géométrique du système, nous pouvons interpréter les courbes force-vitesse.

L'approche thermodynamique de Hill (1981) du cas d'un filament comprimé à ces deux extrémités conduit à l'expression (4.13) de la vitesse. Le mécanisme du Brownian Ratchet proposé par Peskin *et al.* (1993) converge vers la même expression que le modèle de Hill pour $q = 1$.

La description d'un système à N filaments est beaucoup plus complexe et pose le problème

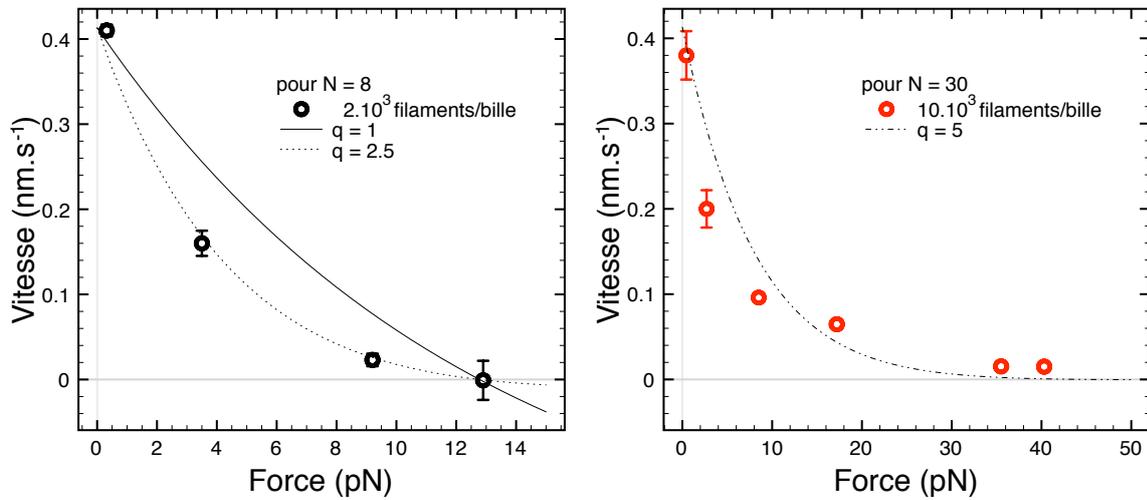


FIG. 8.13 – Comparaison des profils théoriques et expérimentaux pour 4000 et 10000 filaments par bille.

de savoir comment la contrainte est répartie sur l'ensemble de la population. Une première approche consiste à répartir l'ensemble de la force sur les N filaments. L'expression force-vitesse devient

$$v(F) = \delta \left[k_{on}^0 [C] \exp\left(-q \frac{F\delta}{Nk_B T}\right) - k_{off}^0 \exp\left((1-q) \frac{F\delta}{Nk_B T}\right) \right] \quad (8.14)$$

Dans cette relation, tous les paramètres sont connus et les deux seuls paramètres ajustables sont à présent q , paramètres sans dimension, et N , le nombre de filaments. Pour la densité de gelsolines greffées la plus faible, on trouve un nombre de filaments actifs égal à 8 pour coïncider avec la *stalling* force. Puis, on teste les valeurs de q . L'ajustement coïncide pour $q = 2,5$. Pour le densité la plus importante de gelsolines, on trouve $N = 30$ et $q = 5$.

Une autre approche consiste à ne répartir la force que sur les filaments qui « travaillent » et qui se trouvent à une distance x plus petite que la taille d'un monomère δ . Dans une simulation numérique analogue à Mogilner et Oster (1999) et van Doorn *et al.* (2000), on considère N filaments polymérisant contre une barrière et répartis de manière aléatoire le

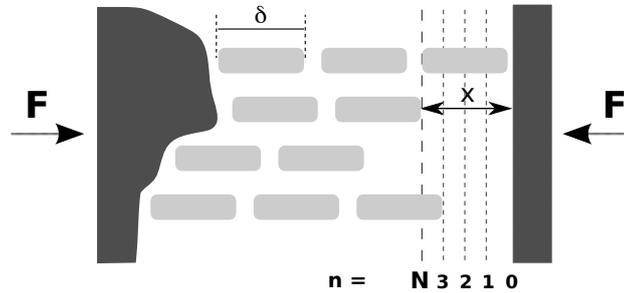


FIG. 8.14 – Schéma des N filaments comprimés par une force F .

long de celle-ci (FIG 8.14) mais à une position p tel que

$$p = n \frac{\delta}{N} \quad \text{avec } n = 1, 2, 3 \text{ à } N \quad (8.15)$$

On évalue ensuite pour chaque filament, la distance x qui sépare son extrémité de la barrière et on considère les constantes cinétiques suivantes :

$$\begin{array}{ll} \text{pour } x > \delta & \text{pour } x < \delta \\ k_{on}(F) = k_{on}^0 & k_{on}(F) = k_{on}^0 \exp\left(-q \frac{F\delta}{k_B T}\right) \\ k_{off}(F) = k_{off}^0 & k_{off}(F) = k_{off}^0 \exp\left((1-q) \frac{F\delta}{k_B T}\right) \end{array} \quad (8.16)$$

Tous les déplacements de la barrière sont ensuite sommés et on remonte ainsi au profil force-vitesse pour un nombre N de filaments. L'ensemble des simulations pour $q = 1$ est reporté sur le graphique 8.15 pour $N = 1, 3, 6, 10, 15$ et 20 .

Dans les deux approches présentées, l'allure général correspond mais le nombre de filaments actifs trouvé est bien inférieur au nombre de filaments qui se trouvent dans la zone de contact, environ une centaine pour $L = 200$ nm et $X = 100$ nm.

A partir des profils force-distance, nous avons montré que des effets entropiques étaient suffisants pour expliquer le comportement mécanique du système. Etablissons à partir de ces forces entropiques, une loi de vitesse.

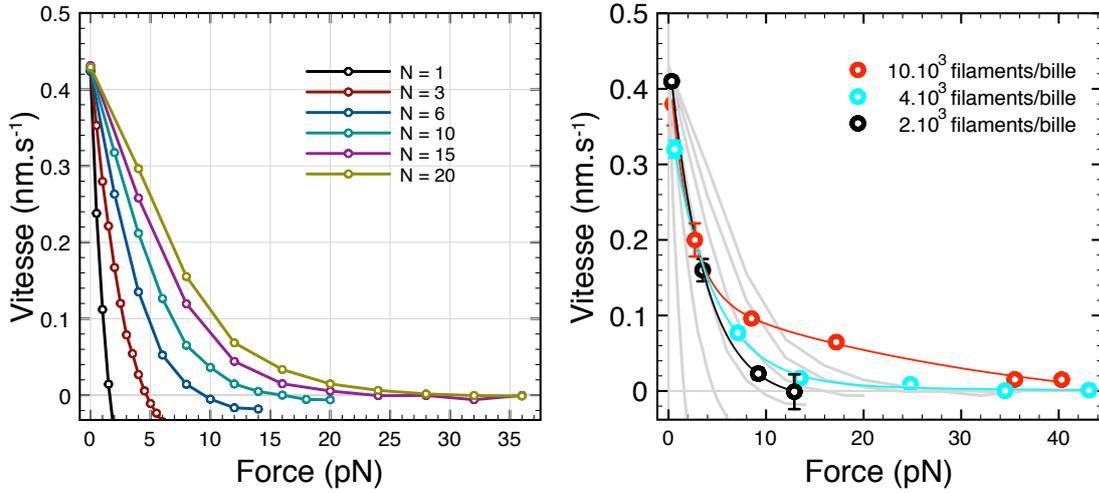


FIG. 8.15 – Comparaison des profils simulés et des profils expérimentaux lorsque la force n'est pas répartie sur l'ensemble de la population.

8.4 De la force entropique à la loi de vitesse

Pour obtenir les profils force-vitesse, les mesures sont réalisées à force magnétique F constante.

Les profils force-distance de la figure 8.16 sont quant à eux réalisés à force magnétique variable et ont mis en évidence des forces entropiques F_N tel que

$$F_N = \frac{k_B T}{X} \times N(X, L, R)$$

Sur ce même graphique, l'axe horizontal rouge nous permet d'accéder à une analyse à force magnétique constante. L'intersection de l'axe rouge avec chaque courbe, traduit un équilibre au sein de la chaîne. En effet, au cours du temps, la longueur des filaments augmentent et ces derniers cherchent un nouvel équilibre : les particules s'écartent et la chaîne se dilate. A chaque nouvel équilibre et puisque la force magnétique est constante, l'équilibre des forces est respecté et la force magnétique est égal aux forces entropiques tel que

$$F = F_N \quad \text{soit} \quad F = \frac{k_B T}{X} \times N(X, L, R)$$

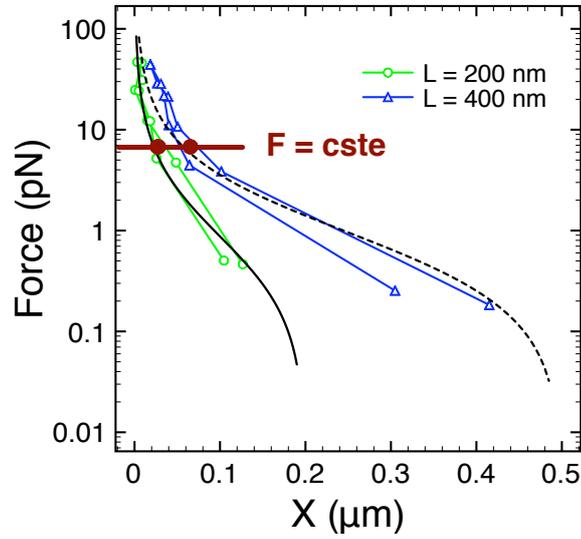


FIG. 8.16 – Mesures mécaniques : à force constante, la longueur des filaments augmente, l'équilibre est déplacé et la chaîne se dilate.

Dans notre expérience, la vitesse d'écartement des particules v_X est donnée par l'évolution de X en fonction du temps. D'après la précédente équation, on en déduit la relation

$$X(L) = \frac{k_B T}{F} \times N(X, L, R)$$

La vitesse d'écartement des particules v_X s'exprime alors par

$$v_X = \frac{dX}{dt} = \frac{dN}{dt} \frac{k_B T}{F} \quad (8.17)$$

$$\text{avec } \frac{dN}{dt} = \frac{\partial N}{\partial X} \frac{dX}{dt} + \frac{\partial N}{\partial L} \frac{dL}{dt} \quad (8.18)$$

$=v_X$ $=v_L$

où dL/dt est la vitesse d'allongement des filaments. D'après la partie 8.2.2, le nombre de filament N est donnée par l'équation (8.6) et rappelée ici par

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

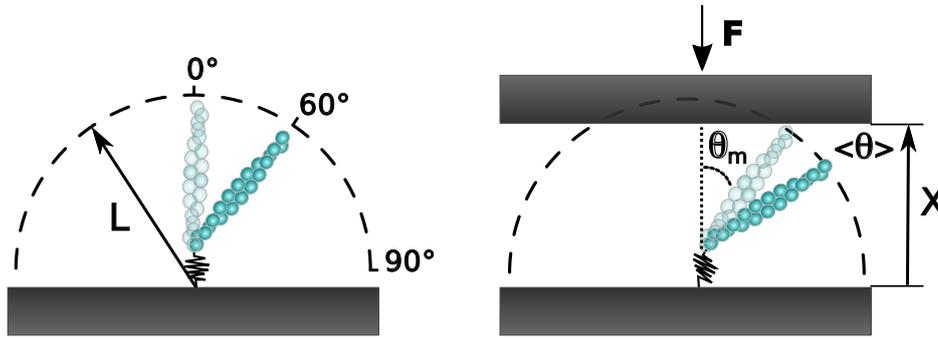


FIG. 8.17 – Orientation moyenne d'un filament.

Un développement limité de cette expression pour L et $X \ll R$ donne les dérivées partielles suivantes au premier ordre

$$\begin{aligned}\frac{\partial N}{\partial L} &= N_{GS} \left(\frac{1}{4R} + \frac{3X-6L}{8R} \right) \\ \frac{\partial N}{\partial X} &= N_{GS} \left(-\frac{1}{4R} + \frac{3L}{8R} \right)\end{aligned}\quad (8.19)$$

En remplaçant dans l'équation (8.20), on obtient que

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{N_{GS}}{4R} v_X + \frac{N_{GS}}{4R} v_L \quad (8.20)$$

En combinant les équations (8.17) et (8.20), l'expression de la vitesse d'écartement des particules est donnée par la relation

$$v_X = \left(\frac{k_B T N_{GS}}{4FR + k_B T N_{GS}} \right) v_L \quad (8.21)$$

A présent, on s'intéresse à l'orientation des filaments à la surface des particules, confinés entre deux plans illustrée sur la figure 8.17. On définit l'angle moyen $\langle \theta \rangle$ tel que

$$\langle \theta \rangle = \frac{\int_{\theta_m}^{\pi/2} \theta \sin \theta . d\theta}{\int_{\theta_m}^{\pi/2} \sin \theta . d\theta} \quad (8.22)$$

où θ_m est l'angle maximal pour lequel l'extrémité du filament est au contact de la surface plane. Le graphique 8.18 représente l'évolution de θ_m et $\langle \theta \rangle$ en fonction de X/L et montre

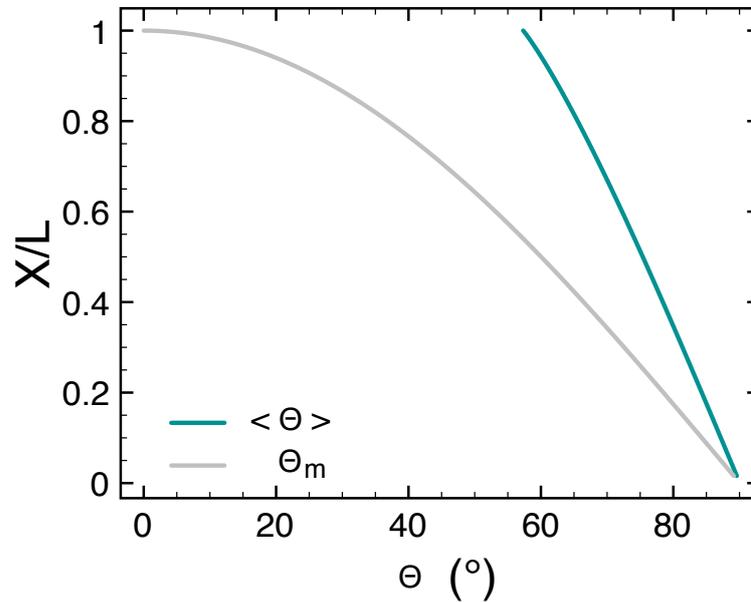


FIG. 8.18 – Evolution de θ_m et $\langle \theta \rangle$ en fonction de X/L où X est la distance entre deux plans et L la longueur des filaments.

que l'angle moyen est toujours supérieur à l'angle maximal. En effet, en absence de plan, soit $X/L = 1$, la position moyenne du filament selon l'équation (8.22) est égale 60° alors que $\theta_m = 0^\circ$. En présence du plan, l'angle maximal θ_m pour $X/L = 0.5$ est égal à 60° , alors que l'angle moyen $\theta_m = 75^\circ$.

En conséquence, l'extrémité des filaments n'est pas en moyenne au contact du plan, et les filaments polymérisent à la vitesse de polymérisation en solution $v(F = 0)$ soit $v_L = v(F = 0)$.

La loi de vitesse devient

$$v_X = \left(\frac{k_B T N_{GS}}{4FR + k_B T N_{GS}} \right) v_{F=0} \quad (8.23)$$

Dans cette équation, il n'y a aucun paramètre ajustable et tous les paramètres sont connus. Les courbes obtenues pour 10000, 4000 et 2000 gelsolines sont représentées sur le graphique A de la figure 8.19.

Pour $F = 0$, le modèle donne bien la vitesse de polymérisation en solution $v(F = 0)$ soit $0,42 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. La vitesse obtenu n'est jamais négative et le modèle ne prédit pas de dépolymérisa-

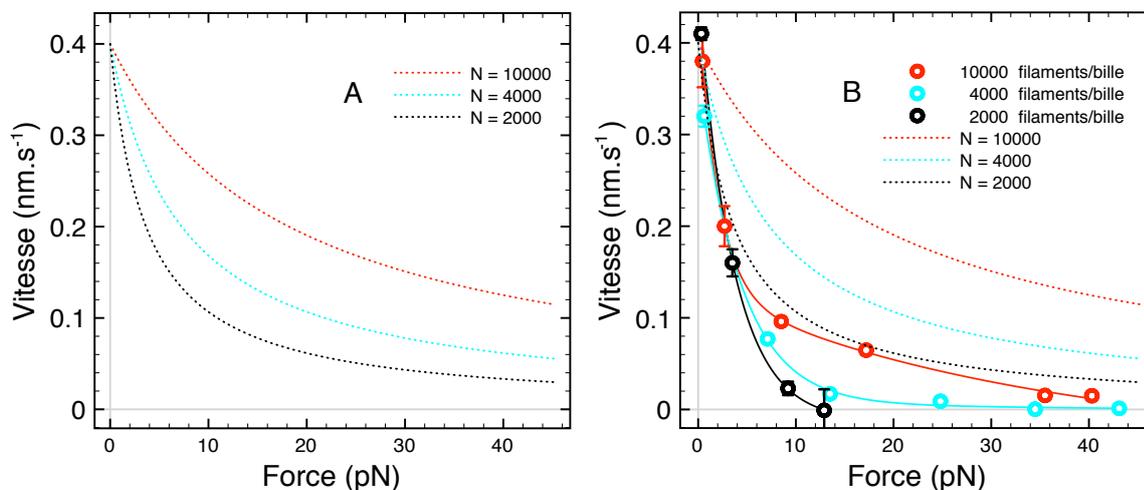


FIG. 8.19 – A. Loi de vitesse pour des forces entropiques pour $N = 10000, 4000, 2000$ filaments par billes. B. Comparaison avec les résultats expérimentaux.

tion de la même manière que dans nos expériences.

Les résultats expérimentaux pour la partie cinétique décrivent un comportement bien précis de notre système et ont démontré que la vitesse d'écartement des particules varie avec la contrainte appliquée et ne dépend pas de la longueur des filaments. La loi de vitesse ainsi prédite ne dépend pas de la longueur L des filaments.

Pour le graphique B de la figure 8.19, les profils force-vitesse expérimentaux ont été ajoutés. La superposition met en évidence un facteur 5 entre la loi de vitesse et l'expérience.

Pour améliorer le modèle, le calcul de la force entropique doit être repris en géométrie sphérique pour tenir compte de la géométrie des particules magnétiques. De plus, l'approximation L et $X \ll R$ n'est pas correct, un calcul plus précis devrait améliorer la simulation.

Pour conclure, dans l'approche thermodynamique de Hill (1981), le filament d'actine considéré comme incompressible et non déformé, est représenté comme étant comprimé à ces deux extrémités. Ce modèle prédit dans ce genre de géométrie illustrée sur le schéma 1 de la figure 8.20, des constantes d'association et de dissociation qui dépendent de la force appliquée et la vitesse d'écartement v_X des deux plans est égale à la vitesse d'allongement des

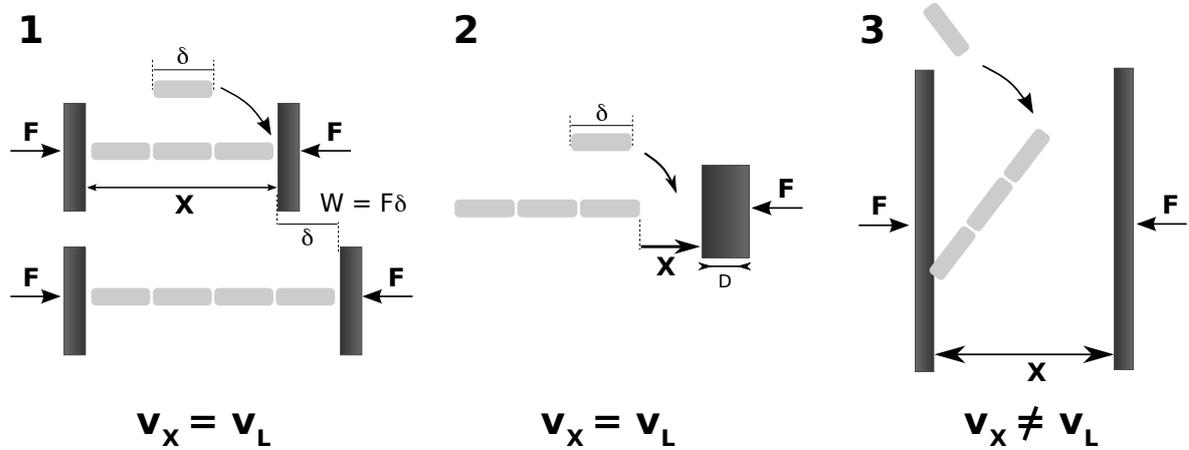


FIG. 8.20 – 1. Approche thermodynamique (Hill, 1981) 2. Brownian Ratchet (Peskin *et al.*, 1993). 3. Force entropique.

filaments v_L . Le modèle du Brownian Ratchet (Peskin *et al.*, 1993) aboutit au même résultat soit $v_X = v_L$.

Dans notre système, l'organisation géométrique des filaments est différente. Les filaments ne sont pas orientés contre la charge et les extrémités pointent en solution. La vitesse de polymérisation n'est donc pas affectée par la force et $v_X \neq v_L$ avec $v_L = v(F = 0)$. La vitesse d'écartement v_X des particules est donnée par l'équilibre des forces à chaque instant tel que la force magnétique appliquée est égale aux forces entropiques. Ce nouveau modèle apporte des idées différentes de ce qui avait été proposé jusqu'à présent. Que ce soit pour les modèles de Hill et du Brownian Ratchet, ou ce nouveau modèle, l'énergie est apportée par la polymérisation de l'actine.

*CHAPITRE 8. FORCE GÉNÉRÉE PAR LA POLYMÉRISATION DE L'ACTINE ET
PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES DES FILAMENTS*

CHAPITRE 9

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons développé une nouvelle technique permettant d'étudier les propriétés mécaniques de filaments d'actine et de comprendre quels processus sont mis en jeu dans la production de la force. Cette méthode utilise des particules magnétiques micrométriques qui s'adaptent à la taille des filaments. Elles permettent à la fois de manipuler les filaments d'actine et d'appliquer une force magnétique compressive sur les filaments qui polymérisent à leur surface. Les gammes de forces comprises entre 0, 1 et 100 pN, permettent d'étudier une population d'une centaine de filaments. La résolution temporelle du dispositif permet de suivre l'évolution de la distance centre à centre des particules qui s'écartent sous l'effet de la polymérisation.

L'étude des propriétés mécaniques des filaments d'actine a montré que l'élasticité des filaments dans la zone de contact est contrôlée par des effets entropiques. Les forces mises en jeu sont trop faibles pour être des forces de flambement et l'ancrage du filament à la surface de la particule est suffisamment flexible pour se plier. Après compression, les configurations

accessibles par l'ensemble du système sont réduites. Ces forces entropiques qui constituent un minimum d'énergie suffisent à expliquer les profils mécaniques expérimentaux.

Les profils force-vitesse détaillent la vitesse d'écartement des particules induite par la polymérisation de l'actine en fonction de la contrainte appliquée. L'allure générale est en accord avec les modèles théoriques, mais ces derniers donnent un nombre de filaments actifs bien inférieur au nombre de filaments qui se trouvent dans le contact des particules.

Une nouvelle loi de vitesse est proposée et la vitesse d'écartement des particules est donnée par l'équilibre des forces magnétique et entropique à chaque instant. Ce nouveaux résultat apporte une nouvelle idée puisqu'il associe la polymérisation de l'actine à une force entropique.

La machine de force développée constitue une puissant outil pour caractériser les propriétés mécaniques des filaments d'actine et les mécanismes de production de leur force. La suite du projet consiste à étudier des assemblages plus complexes. Une première étape serait d'étudier la polymérisation par l'extrémité barbée. Puis d'autres assemblages pourrait être étudiés comme les structures câblées (fascine), les réseaux branchées (Arp2/3) ou encore les réseaux réticulés (filamine).

Quatrième partie

Annexes

Conditions biochimiques et physico-chimiques

A.1 Concentration critique

La concentration critique représente la limite à partir de laquelle les extrémités commencent à polymériser. Pour mesurer ces concentrations, on mesure en spectrométrie de fluorescence le taux d'actine qui a polymérisé à différentes concentrations d'actine C_0 .

Pour des concentrations en actine inférieures à la concentration critique, l'actine reste sous forme de monomères et l'intensité de fluorescence est nulle. Pour $C_0 > C_c$, une quantité $C_0 - C_c$ a polymérisé, plus cette quantité est importante et plus l'intensité de fluorescence mesurée est grande. Pour le bout pointu, la concentration critique ne peut être mesurée directement car le bout barbé polymérise à une concentration plus faible et pour le neutraliser celui-ci est cappée avec la gelsoline.

Pour effectuer la mesure, deux solutions à $5 \mu\text{M}$ d'actine avec et sans gelsoline sont polymérisées, puis diluées dans le tampon F à différentes concentrations en actine. Une fois

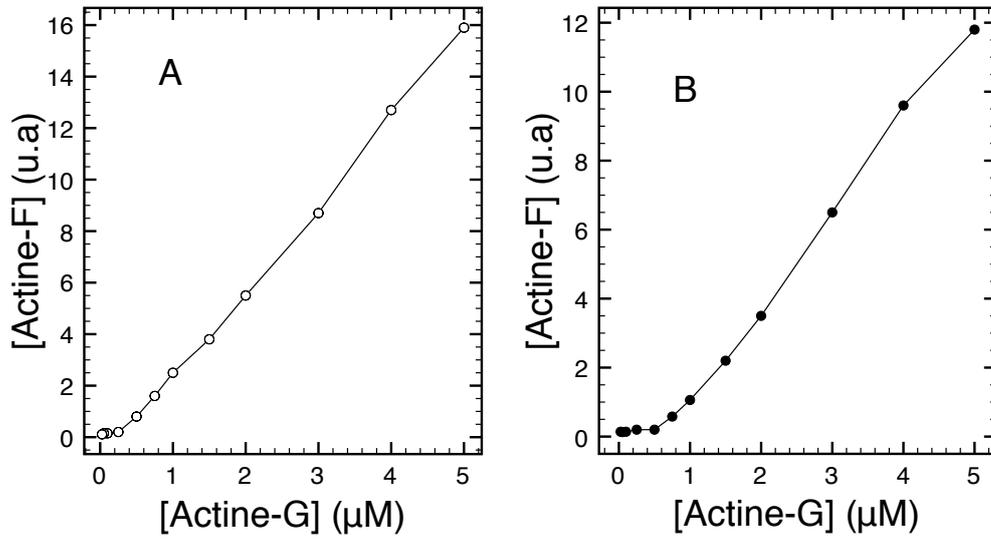


FIG. A.1 – Concentration d'équilibre pour l'extrémité barbée et l'extrémité pointue

l'équilibre établi, on mesure la fluorescence des différentes solutions pour l'extrémité barbée et pour l'extrémité pointue. Les résultats reportés sur la figure A.1 donnent $C_c^p = 0,7 \mu\text{M}$ et $C_c^b = 0,3 \mu\text{M}$.

A.2 Constante d'association k_{on}

En présence de gelsoline, la vitesse de polymérisation de l'actine s'écrit

$$\frac{dF}{dt} = k_{on}^p C \cdot G - k_{off}^p G \quad (\text{A.1})$$

où C est la concentration en actine au temps t , G la concentration en gelsoline et $F = C_0 - C$ avec C_0 la concentration initiale en actine. Par intégration, on obtient

$$F = \frac{k_{on}^p C_0 - k_{off}^p}{k_{on}^p} \left(1 - e^{-k_{on}^p G} \right) \quad (\text{A.2})$$

Les courbes présentées en figure A.2 représente les cinétiques de polymérisation pour $2,5 \mu\text{M}$ d'actine et pour différentes concentrations en GA_2 . L'ajustement par une exponentielle

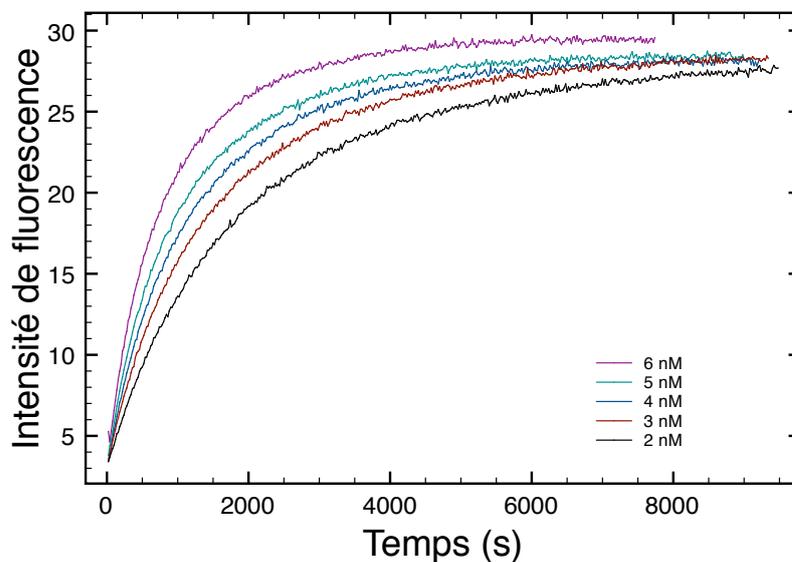


FIG. A.2 – Cinétiques pour différentes concentrations en gelsoline.

de la forme

$$y = y_0 + Ae^{-t/\tau} \quad (\text{A.3})$$

permet de tracer $G = \frac{1}{k_{on} \cdot \tau}$ et d'en déduire la constante d'association k_{on} égale à $0,12 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

A.3 Rappels des conditions expérimentales et des constantes cinétiques

Conditions expérimentales		
	Actine	2 μM
Tampon G	Tris pH 7,8	5 mM
	CaCl ₂	0,2 mM
	ATP	0,2 mM
	DTT	1 mM
	F127	0,5%
	NaN ₃	0,01%
	Activation de la polymérisation	KCl
	Mg	0,6 mM
Tampon F	Tampon G +	KCl 40 mM CaCl ₂ 0,2 mM MgCl ₂ 0,6 mM
Constantes cinétiques		
Bout pointu	k_{on}	0,12 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ soit 0,42 nm.s ⁻¹
	C_c	0,7 μM
	k_{off}	0,084 s ⁻¹
Bout barbé	C_c	0,3 μM

Fonctionnalisation et caractérisation des particules magnétiques

B.1 Fonctionnalisation des particules

B.1.1 Biotinylation de la gelsoline

La gelsoline fournie par Marie-France Carlier et préparée par Dominique Didry, est biotiny-lée avec une sulfo-NHS-biotine selon la réaction de la figure B.1 et qui fait réagir la fonction SNHS avec les sites NH_2 de la protéine.

La gelsoline stockée dans un tampon Tris $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ est d'abord dialysée toute la nuit dans un tampon PBS pH7,5 EGTA 1 mM NaN_3 0,01% pour éliminer les sites NH_2 .

Ensuite, on procède à la biotinylation en faisant réagir 5 μL de SNHS-biotine à 0,2 mM pendant 45 min à température ambiante avec 20 μL de gelsoline à 3,2 μM .

Le nombre de biotine greffée à la gelsoline a été déterminé par dosage en spectrométrie d'absorption. Cette méthode utilise la molécule HABA, un analogue de la biotine, qui se lie

ANNEXE B. FONCTIONNALISATION ET CARACTÉRISATION DES PARTICULES
MAGNÉTIQUES

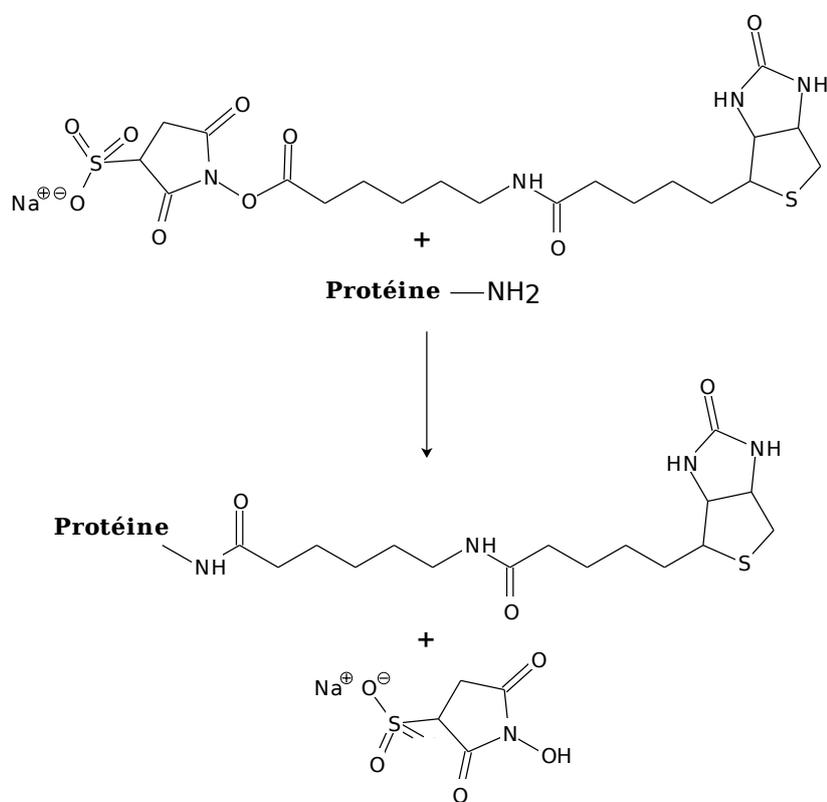


FIG. B.1 – Réaction de biotinylation entre SNHS-biotine et la protéine. La longueur du bras séparant la biotine du groupement SNHS mesure $\approx 13 \text{ \AA}$.

Particules magnétiques (TAB 5.1) Dynabeads MyOne Streptavidin C1 650.01		
Tampon de greffage	Tris pH 7,5	5 mM
	F127	0,5%
	NaN3	0,01%
Tampon S	Tampon G +	Biotine 0,5 mM

TAB. B.1 – Conditions expérimentales pour la fonctionnalisation des particules.

à l'avidine avec une constante d'affinité beaucoup plus faible que la biotine. Le complexe HABA-avidine absorbe à 500 nm et à chaque molécule d'HABA extrait du complexe, le spectre change. On peut ainsi remonter à la quantité de biotine en solution. Nous obtenons un nombre d'environ 16 biotines greffées.

B.1.2 Greffage des particules

Les particules utilisées sont greffées avec des streptavidines et nous utilisons l'interaction streptavidine-biotine pour coupler la gelsoline aux billes.

Lavage des particules : 5 μL de particules à 1% sont lavées trois fois dans le tampon de greffage par sédimentation magnétique.

Couplage : Pour obtenir environ 10000 gelsolines par billes soit environ 1/10 d'une monocouche, il faut introduire une concentration de protéines égales à environ 10 fois la monocouche. Pour greffer 5 μL de particules magnétiques à 1%, il faut ajouter 1 μM de gelsoline. Cette quantité est ajustée selon le taux de recouvrement désiré. Le temps d'incubation est de 10 min. Ensuite, on sature les sites streptavidine avec 0,5 mM de biotine pendant 5 minutes.

Stockage des particules : Les particules sont ensuite lavées 5 fois avec le tampon S et stockées dans 6,5 μL de ce même tampon.

B.1.3 Caractérisation des particules par spectrométrie de fluorescence

La quantité de gelsoline active sur la surface des particules a été mesurée par spectrométrie de fluorescence. Pour cela, on effectue le mélange détaillé dans le tableau B.2.

	1. Tampon G	2. Bille	3. Actine	4. KCl/Mg
Conc. ini.	T _{AB A.3}	0,77%	10 μ M, 10%Pyrène	40 mM / 0,6 mM
Volume (μ L)	117	3	32	8

TAB. B.2 – Conditions expérimentales pour le dosage par spectrométrie de fluorescence.

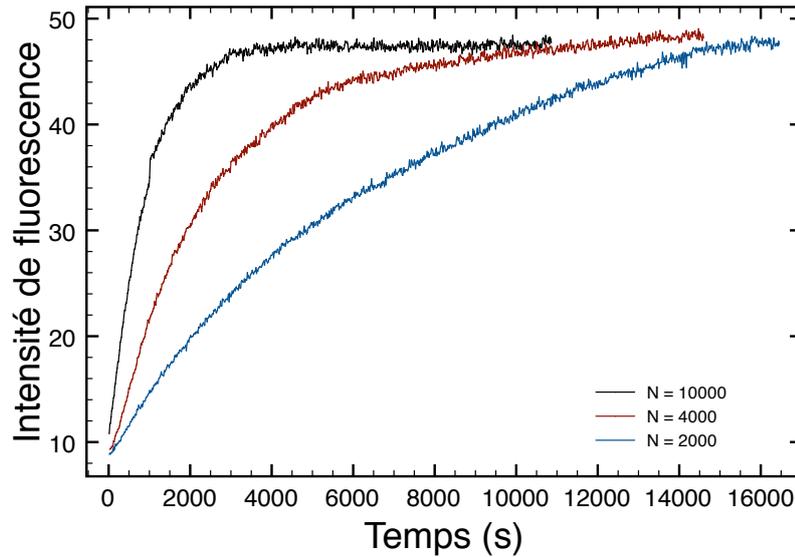


FIG. B.2 – Cinétiques pour les densités de gelsoline $N_{GS} = 10000, 4000$ et 2000 .

Les résultats sont présentés sur la figure B.2 pour trois densités différents de gelsolines. L'analyse des courbes permet de déduire la quantité totale de protéine dosée et contenue dans la cuve soit 10 nM pour la courbe noire, 3 nM pour la courbe rouge et 1 nM pour la courbe bleue. En fonction de la quantité de particules magnétiques fonctionnalisées introduites, le nombre de gelsolines N_{GS} par particules est de 10000, 4000 et 2000 pour les trois courbes respectivement.

Bibliographie

- ABRAHAM, V. C., KRISHNAMURTHI, V., TAYLOR, D. L. et LANNI, F. (1999). The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys J*, 77(3):1721–1732.
- AHUJA, R., PINYOL, R., REICHENBACH, N., CUSTER, L., KLINGENSMITH, J., KESSELS, M. M. et QUALMANN, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2):337–350.
- BATHE, M., HEUSSINGER, C., CLAESSENS, M., BAUSCH, A. R. et FREY, E. (2008). Cytoskeletal bundle mechanics. *Biophys J*, 94(8):2955–2964.
- BERRO, J., MICHELOT, A., BLANCHOIN, L., KOVAR, D. R. et MARTIEL, J.-L. (2007). Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophys J*, 92(7):2546–2558.
- BINNIG, G., QUATE, C. et GERBER, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56(9):930–933.
- BLANCHOIN, L. et POLLARD, T. D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, 41(2):597–602.

- BURTICK, L. D., KOEPF, E. K., GRIMES, J., JONES, E. Y., STUART, D. I., MCLAUGHLIN, P. J. et ROBINSON, R. C. (1997). The crystal structure of plasma gelsolin : implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell*, 90(4):661–670.
- CAMERON, L. A., FOOTER, M. J., van OUDENAARDEN, A. et THERIOT, J. A. (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9):4908–4913.
- CARLIER, M. F., LAURENT, V., SANTOLINI, J., MELKI, R., DIDRY, D., XIA, G. X., HONG, Y., CHUA, N. H. et PANTALONI, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover : implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136(6):1307–1322.
- CARLIER, M. F. et PANTALONI, D. (1986). Direct evidence for adp-pi-f-actin as the major intermediate in atp-actin polymerization. rate of dissociation of pi from actin filaments. *Biochemistry*, 25(24):7789–7792.
- CARLIER, M. F., PANTALONI, D. et KORN, E. D. (1987). The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *J Biol Chem*, 262(7):3052–3059.
- CHARLES, M., MAGDALENA, J., THERIOT, J. A. et GOLDBERG, M. B. (1999). Functional analysis of a *rickettsial* OmpA homology domain of *Shigella flexneri* IcsA. *J Bacteriol*, 181(3):869–878.
- CHAUDHURI, O., PAREKH, S. H. et FLETCHER, D. A. (2007). Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445(7125):295–298.
- CLAESSENS, M., BATHE, M., FREY, E. et BAUSCH, A. R. (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. *Nat Mater*, 5(9):748–753.

- COHEN-TANNOUJJI, L. (2006). *Cinétique de réactions ligand - récepteur en surface - Etude fondée sur l'utilisation de colloïdes magnétiques*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.
- COHEN-TANNOUJJI, L., BERTRAND, E., BAUDRY, J., ROBIC, C., GOUBAULT, C., PELLISSIER, M., JOHNER, A., THALMANN, F., LEE, N. K., MARQUES, C. M. et BIBETTE, J. (2008). Measuring the kinetics of biomolecular recognition with magnetic colloids. *Phys Rev Lett*, 100(10):108301.
- COUÉ, M. et KORN, E. D. (1985). Interaction of plasma gelsolin with G-actin and F-actin in the presence and absence of calcium ions. *J Biol Chem*, 260(28):15033–15041.
- CROCKER, J. et GRIER, D. (1994). Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid. *Phys Rev Lett*, 73(2):352–355.
- CROCKER, J. C. et 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. et SOUTHWICK, F. S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(16):6068–6072.
- DERJAGUIN, B. V. et LANDAU, L. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochimica*, 14:633.
- DICKINSON, R. B. et PURICH, D. L. (2002). Clamped-filament elongation model for actin-based motors. *Biophys J*, 82(2):605–617.
- DOGTEROM, M. et YURKE, B. (1997). Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science*, 278(5339):856–860.

- DREYFUS, R. (2005). *Filaments magnétiques : application à la conception de capteurs de forces et de nageurs microscopiques artificiels*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.
- EGILE, C., LOISEL, T. P., LAURENT, V., LI, R., PANTALONI, D., SANSONETTI, P. J. et CARLIER, M. F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol*, 146(6):1319–1332.
- EGUILUZ, V. M., OSPECK, M., CHOE, Y., HUDSPETH, A. J. et MAGNASCO, M. O. (2000). Essential nonlinearities in hearing. *Phys Rev Lett*, 84(22):5232–5235.
- FONNUM, G., JOHANSSON, C., MOLTEBERG, A., MORUP, S. et AKSNES, E. (2005). Characterisation of Dynabeads by magnetization measurements and Mossbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1):41–47.
- FOOTER, M. J., KERSSEMAKERS, J. W. J., THERIOT, J. A. et DOGTEROM, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7):2181–2186.
- FRISCHKNECHT, F. et WAY, M. (2001). Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*, 11(1):30–38.
- GARDEL, M. L., NAKAMURA, F., HARTWIG, J., CROCKER, J. C., STOSSEL, T. P. et WEITZ, D. A. (2006). Stress-dependent elasticity of composite actin networks as a model for cell behavior. *Phys Rev Lett*, 96(8):088102.
- GARDEL, M. L., SHIN, J. H., MACKINTOSH, F. C., MAHADEVAN, L., MATSUDAIRA, P. et WEITZ, D. A. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science*, 304(5675):1301–1305.

- GERBAL, F., CHAIKIN, P., RABIN, Y. et PROST, J. (2000a). An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion. *Biophys J*, 79(5):2259–2275.
- GERBAL, F., LAURENT, V., OTT, A., CARLIER, M. F., CHAIKIN, P. et PROST, J. (2000b). Measurement of the elasticity of the actin tail of *Listeria monocytogenes*. *Eur Biophys J*, 29(2):134–140.
- GITTES, F., MICKEY, B., NETTLETON, J. et HOWARD, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, 120(4):923–934.
- GOFF, L. L., HALLATSCHEK, O., FREY, E. et AMBLARD, F. (2002). Tracer studies on F-actin fluctuations. *Phys Rev Lett*, 89(25):258101.
- GOSSE, C. et CROQUETTE, V. (2002). Magnetic tweezers : micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J*, 82(6):3314–3329.
- GOUBAULT, C., LEAL-CALDERON, F., VIOVY, J.-L. et BIBETTE, J. (2005). Self-assembled magnetic nanowires made irreversible by polymer bridging. *Langmuir*, 21(9):3725–3729.
- HAGERMAN, P. J. (1988). Flexibility of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 17:265–286.
- HEINZEN, R. A., HAYES, S. F., PEACOCK, M. G. et HACKSTADT, T. (1993). Directional actin polymerization associated with spotted fever group *Rickettsia* infection of Vero cells. *Infect Immun*, 61(5):1926–1935.
- HEUSSINGER, C., SCHAEFER, B. et FREY, E. (2007). Nonaffine rubber elasticity for stiff polymer networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 76(3 Pt 1):031906.

- HILL (1981). Microfilament or microtubule assembly or disassembly against a force. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 78:5613–5617.
- HOWARD, J. (2001). *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc.
- HOWARD, J. et ASHMORE, J. F. (1986). Stiffness of sensory hair bundles in the sacculus of the frog. *Hear Res*, 23(1):93–104.
- HUDSPETH, A. J. et JACOBS, R. (1979). Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells (auditory system/cilium/vestibular system). *Proc Natl Acad Sci*, 76(3):1506–1509.
- INOUE, S. et TILNEY, L. G. (1982). Acrosomal reaction of thymosin sperm. i. changes in the sperm head visualized by high resolution video microscopy. *J Cell Biol*, 93(3):812–819.
- ISAMBERT, H., VENIER, P., MAGGS, A. C., FATTOUM, A., KASSAB, R., PANTALONI, D. et CARLIER, M. F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem*, 270(19):11437–11444.
- JANMEY, P. A., HVIDT, S., LAMB, J. et STOSSEL, T. P. (1990). Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks. *Nature*, 345(6270):89–92.
- JANMEY, P. A., PEETERMANS, J., ZANER, K. S., STOSSEL, T. P. et TANAKA, T. (1986). Structure and mobility of actin filaments as measured by quasielastic light scattering, viscometry, and electron microscopy. *J Biol Chem*, 261(18):8357–8362.
- KABSCH, W., MANNHERZ, H. G., SUCK, D., PAI, E. F. et HOLMES, K. C. (1990). Atomic structure of the actin :DNase I complex. *Nature*, 347(6288):37–44.

- KIM, J. H., KWON, S. K. et KIM, C. O. (2002). Adhesion of photosensitizer to ferrofluids for use in photodynamic therapy use in photodynamic therapy. *Nanotechnology*, 13:610–614.
- KOCKS, C., MARCHAND, J. B., GOUIN, E., D’HAUTEVILLE, H., SANSONETTI, P. J., CARLIER, M. F. et COSSART, P. (1995). The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol Microbiol*, 18(3):413–423.
- KOENIG, A. (2005). *Etude d’un polymère semi-flexible à l’aide de colloïdes magnétiques : exemple de l’ADN*. Thèse de doctorat, Université Paris VI.
- KOENIG, A., HÉBRAUD, P., GOSSE, C., DREYFUS, R., BAUDRY, J., BERTRAND, E. et BIBETTE, J. (2005). Magnetic force probe for nanoscale biomolecules. *Phys Rev Lett*, 95(12):128301.
- KOVAR, D. R., HARRIS, E. S., MAHAFFY, R., HIGGS, H. N. et POLLARD, T. D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2):423–435.
- KOVAR, D. R., KUHN, J. R., TICHY, A. L. et POLLARD, T. D. (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol*, 161(5):875–887.
- KOVAR, D. R. et POLLARD, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41):14725–14730.
- LANDAU, L. D. et LIFSHITZ, E. M. (1986). *Theory of elasticity*. Pergamon Press.
- leal CALDERON, F., STORA, T., MONVAL, O. M., POULAIN, P. et BIBETTE, J. (1994). Direct measurement of colloidal forces. *Phys Rev Lett*, 72:2959–2962.

- LECUIT, M., OHAYON, H., BRAUN, L., MENGAUD, J. et COSSART, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun*, 65(12):5309–5319.
- LEE, L., KLEE, S. K., EVANGELISTA, M., BOONE, C. et PELLMAN, D. (1999). Control of mitotic spindle position by the *Saccharomyces cerevisiae* formin Bni1p. *J Cell Biol*, 144(5):947–961.
- LOCKER, J. K., KUEHN, A., SCHLEICH, S., RUTTER, G., HOHENBERG, H., WEPF, R. et GRIFFITHS, G. (2000). Entry of the two infectious forms of *vaccinia* virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol Biol Cell*, 11(7):2497–2511.
- LOISEL, T. P., BOUJEMAA, R., PANTALONI, D. et 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. et SYKES, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16):5992–5997.
- MARTIN, P., BOZOVIC, D., CHOE, Y. et HUDSPETH, A. J. (2003). Spontaneous oscillation by hair bundles of the bullfrog's sacculus. *J Neurosci*, 23(11):4533–4548.
- MENGAUD, J., OHAYON, H., GOUNON, P., R-M, M. et COSSART, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, 84(6):923–932.
- MILLER, I. C. et WILLIAMS, D. R. (2000). Steric interaction of an incoming particle with

- grafted rods : exact solutions and unusual force profiles. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 61(5 Pt A):R4706–9.
- MOGILNER et OSTER (1999). The polymerization ratchet model explains the force-velocity relation for growing microtubules. *Eur Biophys J*, 28:235–242.
- MONDAIN-MONVAL, ESPERT, OMARJEE, BIBETTE, LEAL-CALDERON, PHILIP et JOANNY (1998). Polymer-induced repulsive forces : exponential scaling. *Phys Rev Lett*, 80(23):1778–1781.
- MOORE, P. B., HUXLEY, H. E. et DEROSIER, D. J. (1970). Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J Mol Biol*, 50(2):279–295.
- MOREAU, V., FRISCHKNECHT, F., RECKMANN, I., VINCENELLI, R., RABUT, G., STEWART, D. et WAY, M. (2000). A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol*, 2(7):441–448.
- NAGASHIMA, H. et ASAKURA, S. (1980). Dark-field light microscopic study of the flexibility of F-actin complexes. *J Mol Biol*, 136(2):169–182.
- NOIREAUX, V., GOLSTEYN, R. M., FRIEDERICH, E., PROST, J., ANTONY, C., LOUWARD, D. et SYKES, C. (2000). Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys J*, 78(3):1643–1654.
- OTT, MAGNASCO, SIMON et LIBCHABER (1993). Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 48(3):R1642–R1645.
- PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., JONES, S. K. et DOBSON, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36:R167–R181.

- PANTALONI, D., BOUJEMAA, R., DIDRY, D., GOUNON, P. et CARLIER, M. F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends : functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol*, 2(7):385–391.
- PANTALONI, D. et CARLIER, M. F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*, 75(5):1007–1014.
- PAREKH, S. H., CHAUDHURI, O., THERIOT, J. A. et FLETCHER, D. A. (2005). Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nat Cell Biol*, 7(12):1219–1223.
- PENG, J., WALLAR, B. J., FLANDERS, A., SWIATEK, P. J. et ALBERTS, A. S. (2003). Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol*, 13(7):534–545.
- PESKIN, C. S., ODELL, G. M. et OSTER, G. F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations : the brownian ratchet. *Biophys J*, 65(1):316–324.
- POLLARD, T. D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2747–2754.
- POLLARD, T. D., BLANCHOIN, L. et MULLINS, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:545–576.
- POLLARD, T. D. et BORISY, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4):453–465.
- POLLARD, T. D. et MOOSEKER, M. S. (1981). Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J Cell Biol*, 88(3):654–659.

- POLLARD, T. D. et WEEDS, A. G. (1984). The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett*, 170(1):94–98.
- PROST, J. (2001). *Physics of bio-molecules and cells*. Springer.
- PRUYNE, D., EVANGELISTA, M., YANG, C., BI, E., ZIGMOND, S., BRETSCHER, A. et BOONE, C. (2002). Role of formins in actin assembly : nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581):612–615.
- QUINLAN, M. E., HEUSER, J. E., KERKHOFF, E. et MULLINS, R. D. (2005). Drosophila spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024):382–388.
- RENAULT, L., BUGYI, B. et CARLIER, M.-F. (2008). Spire and cordon-bleu : multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol*.
- ROMERO, S., CLAINCHE, C. L., DIDRY, D., EGILE, C., PANTALONI, D. et CARLIER, M.-F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*, 119(3):419–429.
- ROMERO, S., DIDRY, D., LARQUET, E., BOISSET, N., PANTALONI, D. et CARLIER, M.-F. (2007). How ATP hydrolysis controls filament assembly from profilin-actin : implication for formin processivity. *J Biol Chem*, 282(11):8435–8445.
- SAGOT, I., RODAL, A. A., MOSELEY, J., GOODE, B. L. et PELLMAN, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*, 4(8):626–631.
- SCHAUB, S., MEISTER, J.-J. et VERKHOVSKY, A. B. (2007). Analysis of actin filament network organization in lamellipodia by comparing experimental and simulated images. *J Cell Sci*, 120(Pt 8):1491–1500.

- SCHLECH, W. F., LAVIGNE, P. M., BORTOLUSSI, R. A., ALLEN, A. C., HALDANE, E. V., WORT, A. J., HIGHTOWER, A. W., JOHNSON, S. E., KING, S. H., NICHOLLS, E. S. et BROOME, C. V. (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N Engl J Med*, 308(4):203–206.
- SHEVKOPLYAS, S. S., SIEGEL, A. C., WESTERVELT, R. M., PRENTISS, M. G. et WHITESIDES, G. M. (2007). The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field. *Lab Chip*, 7(10):1294–1302.
- SMALL, J. V. et RESCH, G. P. (2005). The comings and goings of actin : coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, 17(5):517–523.
- STERN, LIVINS et ZHANG (1991). Thermal vibration and melting from a local perspective. *Phys Rev B Condens Matter*, 43(11):8850–8860.
- STORM, C., PASTORE, J. J., MACKINTOSH, F. C., LUBENSKY, T. C. et JANMEY, P. A. (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature*, 435(7039):191–194.
- STRICK, T. R., ALLEMAND, J. F., BENSIMON, D., BENSIMON, A. et CROQUETTE, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science*, 271(5257):1835–1837.
- SVITKINA, T. M., VERKHOVSKY, A. B., MCQUADE, K. M. et BORISY, G. G. (1997). Analysis of the actin-myosin ii system in fish epidermal keratocytes : mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol*, 139(2):397–415.
- TABOR, D. et WINTERTON, R. H. (1968). Surface forces : direct measurement of normal and retarded van der Waals forces. *Nature*, 219(5159):1120–1121.
- TAKEBAYASHI, T., MORITA, Y. et OOSAWA, F. (1977). Electron microscopic investigation of the flexibility of F-actin. *Biochim Biophys Acta*, 492(2):357–363.

- THERIOT, J. A. (2000). The polymerization motor. *Traffic*, 1:19–28.
- THERIOT, J. A. et MITCHISON, T. J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*, 352(6331):126–131.
- THERIOT, J. A., MITCHISON, T. J., TILNEY, L. G. et PORTNOY, D. A. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature*, 357(6375):257–260.
- TILNEY, L. G., HATANO, S., ISHIKAWA, H. et MOOSEKER, M. S. (1973). The polymerization of actin : its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *J Cell Biol*, 59(1):109–126.
- TILNEY, L. G. et PORTNOY, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, 109(4 Pt 1):1597–1608.
- TINEVEZ, J.-Y., JULICHER, F. et MARTIN, P. (2007). Unifying the various incarnations of active hair-bundle motility by the vertebrate hair cell. *Biophys J*, 93(11):4053–4067.
- UGELSTAD, J., HANSEN, F., SHINKAI, M. et LANGE, S. (1974). Emulsion polymerization of styrene with sodium hexadecylsulfate/hexadecanol mixtures as emulsifiers - initiation in monomer droplets. *Makromol. Chem.*, 175 (2):507.
- UGELSTAD, J. et MORK, P. (1980). Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of emulsion and polymer dispersions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 13:101.
- UGELSTAD, J., STENSTAD, P., KILAAS, L., PRESTVIK, W. S., HERJE, R., BERGE, A. et HORNES, E. (1993). Monodisperse magnetic polymer particles. New biochemical and biomedical applications. *Blood Purif*, 11(6):349–369.

- VALENTIN-RANC, C. et CARLIER, M. F. (1991). Role of ATP-bound divalent metal ion in the conformation and function of actin. Comparison of Mg-ATP, Ca-ATP, and metal ion-free ATP-actin. *J Biol Chem*, 266(12):7668–7675.
- van DOORN, G. S., TANASE, C., MULDER, B. M. et DOGTEROM, M. (2000). On the stall force for growing microtubules. *Eur Biophys J*, 29(1):2–6.
- van OMMERING, K. et NIEUWENHUIS, J. H. (2006). Confined brownian motion of individual magnetic nanoparticles on a chip : characterization of magnetic susceptibility. *App Phys Lett*, 89:142511.
- VERWEY, J. W. et OVERBEEK, J. T. (1948). *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier, Amsterdam.
- WACHSSTOCK, D. H., SCHWARZ, W. H. et POLLARD, T. D. (1994). Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophys J*, 66(3 Pt 1):801–809.
- WANG, Y. L. (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts : possible role of treadmilling. *J Cell Biol*, 101(2):597–602.
- WEGNER, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108(1):139–150.
- WELCH, M. D., IWAMATSU, A. et MITCHISON, T. J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 385(6613):265–269.
- WINCKLER, B. et SCHAFER, D. A. (2007). Cordon-bleu : a new taste in actin nucleation. *Cell*, 131(2):236–238.
- XU, J., TSENG, Y. et WIRTZ, D. (2000). Strain hardening of actin filament networks. regu-

- lation by the dynamic cross-linking protein alpha-actinin. *J Biol Chem*, 275(46):35886–35892.
- YANAGIDA, T., NAKASE, M., NISHIYAMA, K. et OOSAWA, F. (1984). Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature*, 307(5946):58–60.
- YIN, H. L. et STOSSEL, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*, 281(5732):583–586.
- ZHANG et WIDOM (1995). Field-induced forces in colloidal particle chains. *Phys Rev E*, 51(3):2099–2103.

Résumé

Plusieurs mécanismes biologiques utilisent la polymérisation des filaments d'actine comme moteur mécanique. L'énergie chimique libérée à l'addition d'un monomère dans le filament est convertie en travail mécanique et une force est générée. Les filaments ainsi formés s'organisent grâce à des protéines liant l'actine et forment des structures qui diffèrent par leurs propriétés mécaniques et élastiques mais aussi de leurs fonctions dans les différents processus biologiques.

Notre système expérimental permet d'étudier le lien entre les propriétés mécaniques et les mécanismes à l'origine de la production de la force. La polymérisation des filaments est directement initiée sur la surface de particules magnétiques. En présence d'un champ magnétique, ces dernières s'organisent en chaîne par des interactions dipôle-dipôle, et une force magnétique compressive est induite sur les filaments qui polymérisent. La polymérisation écartent les particules au cours du temps et en fonction de la force appliquée, la vitesse d'écartement des particules est ralentie. En suivant l'évolution de la distance entre particules, nous détaillons la relation force-vitesse et les propriétés mécaniques des filaments.

Abstract

Several biological mechanisms use polymerization of actin filaments as mechanical motor. The chemical energy released with the addition of a monomer in the filament is converted into mechanical work thereby generating a force. Filaments are regulated by actin binding proteins, and form structures that possess different mechanical and elastical properties, and also different functions in the biological processes.

Our experimental setup permits to study the link between the mechanical properties and the mechanisms that produce a force. The polymerization of actin filaments is directly initiated on the surface of magnetic particles. Within a magnetic field, particles organize themselves in a chain due to dipole-dipole interactions, and a compressive force is induced on the polymerizing filaments. Polymerization pushes the particles apart over time and as a function of the applied force, the velocity of the particles gap slows down. While following the evolution of the distance between particles, we obtain information on the force-velocity profile and the mechanical properties of the filaments.