



HAL
open science

Étude mécanique des gels d'actine branchés

Thomas Pujol

► **To cite this version:**

Thomas Pujol. Étude mécanique des gels d'actine branchés. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. NNT: . pastel-00874094

HAL Id: pastel-00874094

<https://pastel.hal.science/pastel-00874094v1>

Submitted on 17 Oct 2013

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. DIDEROT (Paris 7)
École Doctorale Matière Condensée et Interfaces

Sujet de la thèse :

Étude mécanique des gels d'actine branchés

Présentée par

THOMAS PUJOL

Pour obtenir le titre de :
Docteur de l'Université Paris VII

Laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes
Spécialité **Biophysique**

Soutenue le 11 décembre 2012 devant le jury composé de :

M. Atef ASNACIOS	Président
M. Laurent BLANCHOIN	Rapporteur
M. Albrecht OTT	Rapporteur
M. Karsten KRUSE	Examinateur
Mme Laurence RAMOS	Examinatrice
Mme Cécile SYKES	Examinatrice
Mme Olivia du ROURE	Directrice de thèse
M. Julien HEUVINGH	Directeur de thèse

Merci à :

Olivia et Julien, mon guide bicéphale.
Je vous dois l'essentiel, le savoir et la " dalle "
Vous fitent d'un novice aux neurones en jachère
Un curieux de l'actine aux infinis mystères.

A Jo, venu d'Albion, compagnon de paillasse ;
M'aida de sa présence, me sortit de l'impasse.
Aux éphémères stagiaires qui, débordant d'envie,
Apportèrent la lumière tout au fond de mon puits.

Au PMMH aussi, dans sa globalité.
Qu'il a bien du charme ce labo morcelé
I.T.A, permanents post docs et doctorants
Y partagent leur savoir, et quel que soit leur rang.

Trois ans durant tu fus le décor de ma vie,
Faites de découvertes, d'hypothèses et d'envies,
De déceptions aussi et d'échecs parfois
Obstacles bénéfiques qui confortent la Foi

A mes amis Adam, Anthony et Simon
Qui barrèrent la nef alors en perdition,
Malgré les doutes, les tempêtes, et les errances
Vous conservâtes le cap de ma Bonne Espérance.

A tous ceux côtoyés durant ces épiques années
De leur sceau les bons moments à jamais marqués,
Ainsi épicée l'étude fut délicieuse.
Une vie de science n'est rien sans compagnie heureuse

A mes chers géniteurs et ma tribu "impec" :
Pujol, Longueville, Mercier, Perennec
Quel drôle de nom pour une balise Argos !
Qui jamais ne me quitte toujours dans le sac à dos

Et puisqu'il faut conclure sur un ton... doctoral ;
Doctoral, de fraîche date, il est vrai. C'est génial !,
Allons s'caler l'appétit plutôt que l'esprit
Le festin attend, digne de Marco Ferreri.

Table des matières

Introduction	7
1 La mécanique cellulaire	9
1.1 Propriétés mécaniques d'une cellule entière	9
1.2 Le cytosquelette	12
1.2.1 Les microtubules	12
1.2.2 Les filaments intermédiaires	12
1.2.3 Les microfilaments	12
1.3 Les filaments d'actine	13
1.3.1 La protéine	13
1.3.2 Dynamique de polymérisation	14
1.3.3 Les partenaires de l'actine	15
1.4 Les réseaux d'actine dans la cellule	16
1.4.1 Cortex et fibres de stress	17
1.4.2 Les structures de la migration cellulaire	18
2 Mécanique des réseaux de polymères	21
2.1 Introduction	21
2.1.1 Description macroscopique	23
2.1.2 Description microscopique	24
2.2 Modèles	24
2.2.1 Chaîne souple $L_p \ll L$	25
2.2.2 Chaîne semi-flexible ($L_p \sim L$)	27
2.2.3 Polymère rigide $L_p \gg L$	29
2.2.4 Simulations	31
Tableau récapitulatif des modèles mécaniques	35
2.3 Expériences de mécanique sur gels d'actine reconstitués	35
2.3.1 Gels assemblés en solution	35
2.3.2 Réseaux assemblés à partir d'une surface	43
3 Aspects expérimentaux	47
3.1 Principe général de l'expérience	47
3.2 Assemblage in vitro d'un réseau branché d'actine	48
3.2.1 Historique	48
3.2.2 Modèle de la machinerie Arp2/3	52
3.3 Colloïdes superparamagnétiques et mesure de force	56
3.3.1 Colloïdes superparamagnétiques	56
3.3.2 Interactions entre colloïdes	59

3.4	Montage expérimental	60
3.4.1	Description	60
3.4.2	Champ magnétique	63
3.5	Traitement d'image	64
3.5.1	Détermination de la distance entre colloïdes	64
3.5.2	Mesure de fluorescence	65
3.6	Détermination du module élastique : modèle de Hertz	68
3.6.1	Modèle de Hertz par analyse dimensionnelle	69
3.6.2	Application du modèle de Hertz dans notre système	70
3.7	Déroulement de la mesure	72
4	Résultats	75
4.1	Une nouvelle méthode de mesure	75
4.1.1	Résultats typiques	75
4.1.2	Validation	79
4.2	Etude systématique	85
4.2.1	Impact de la phalloïdine	85
4.2.2	Rôle de l'architecture	87
4.3	Propriétés non linéaires	92
4.3.1	Effet des contraintes internes	92
4.3.2	Estimation du module différentiel	95
5	Discussion et perspectives	99
5.1	Discussion	99
5.1.1	Rôle des protéines	100
5.1.2	Origine microscopique de l'élasticité	101
5.2	Perspectives	105
5.2.1	Perspectives directes	105
5.2.2	Mesures par colloïdes à faces planes	106
	Annexes	119
A	Relation entre les grandeurs mécaniques macroscopiques	119
B	Concentration des tampons	121
C	Mesure de l'épaisseur	123
D	Publication	125

Introduction

Cette thèse est consacrée à l'étude des propriétés mécaniques des réseaux d'actine branchés. Dans le chapitre 1, je souligne l'importance de la mécanique au niveau cellulaire. Je présente ensuite le filament d'actine et les différents réseaux qu'il forme in vivo.

Le chapitre 2 est consacré à une présentation des matériaux polymères et des différents modèles liant les grandeurs microscopiques des réseaux de polymères à leurs propriétés mécaniques macroscopiques. La deuxième partie de ce chapitre revient sur les principaux résultats des études mécaniques menées sur les réseaux d'actine polymérisée en solution et polymérisée à partir d'une surface.

Les différents aspects expérimentaux de notre dispositif sont abordés dans le chapitre 3. Je décris d'abord le milieu de motilité permettant de polymériser in vitro un gel d'actine branché. J'évoque ensuite les différents aspects de notre "machine de force" : la génération du champ magnétique et la mesure de la distance entre les particules. Pour finir, je présente le contact entre sphères et le modèle de Hertz utilisé pour ajuster nos données brutes.

Les résultats de cette thèse font l'objet du chapitre 4. Je commence par des résultats permettant de valider cette nouvelle technique expérimentale, puis je détaille l'étude systématique qui m'a permis de lier architecture et élasticité dans les réseaux d'actine branchés. Pour finir, je présente deux méthodes indirectes qui permettent d'évaluer les propriétés non linéaires de ces réseaux.

Dans le dernier chapitre je discute des résultats obtenus, en particulier de l'effet des différentes protéines sur l'architecture et la mécanique du réseau d'actine. J'interprète également nos résultats dans le cadre des différents modèles mécaniques présentés dans le chapitre 2. Enfin, je propose différentes perspectives ouvertes par la présente thèse.

Chapitre 1

La mécanique cellulaire

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la place et au rôle joués par la mécanique en biologie. Nous commencerons par considérer la cellule comme un tout, en présentant d'une part quelques unes des études qui illustrent le rôle essentiel joué par la mécanique dans la vie d'une cellule, et d'autre part les montages expérimentaux et les modèles proposés pour étudier et décrire la mécanique d'une cellule. Nous changerons ensuite d'échelle en décrivant la structure cellulaire à l'origine de ces propriétés : le cytosquelette. L'un des constituants majeurs du cytosquelette et l'objet de cette thèse est la protéine d'actine. Nous aborderons la structure particulière de cette protéine qui conduit à une dynamique de polymérisation originale. In vivo l'actine n'intervient jamais seule, elle interagit avec un très grand nombre de protéines partenaires appelées ABP (Actin Binding Proteins) que l'on peut regrouper en deux catégories : les ABP qui régulent la dynamique d'assemblage/désassemblage des monomères et celles qui organisent les filaments les uns par rapport aux autres.

L'actine et ses partenaires sont à l'origine de la forme, de la rigidité et des propriétés migratoires d'une cellule. Toutes ses fonctions sont réalisées au travers d'assemblages dynamiques de filaments d'actine à l'intérieur du cytoplasme appelés mésostructures : le cortex, les fibres de stress, le lamellipode et les filipodes. L'agencement des filaments les uns par rapport aux autres dans ces mésostructures est qualifié d'architecture du réseau. Nous verrons que chaque mésostructure a une architecture propre que l'on peut lier aux ABP qui participent à sa formation et qui lui permet de remplir le rôle qui lui est dévolu au sein de la cellule.

1.1 Propriétés mécaniques d'une cellule entière

Les domaines où la mécanique cellulaire occupe une place centrale sont nombreux. En physiologie, on peut remarquer le lien entre l'extraordinaire diversité de fonction des organes et le large spectre de leurs propriétés mécaniques. Les os sont suffisamment rigides pour soutenir le poids de l'organisme mais non cassants pour limiter les fractures, alors que les poumons ont un domaine élastique très large pour soutenir la déformation importante liée à l'inspiration. En médecine, le diagnostic de certains cancers se fait par palpation (dans le cas du cancer du sein, la rigidité du tissu cancéreux passe de 150 Pa à 4000 Pa). La mécanique cellulaire est également impliquée dans de nombreuses pathologies, par exemple la diminution des capacités respiratoires induite par l'emphysème pulmonaire fait suite à une diminution de rigidité des poumons de 40% (Yuan et al., 2000).

L'environnement mécanique joue un rôle dans le développement et la vie d'une cellule au même titre que les signaux biochimiques. Certaines fonctions cellulaires sont déclenchées par des paramètres mécaniques extérieurs : forces, déformations mais aussi rigidité de l'environnement (Discher et al., 2005; Vogel and Sheetz, 2006; Discher et al., 2009). Les cellules épithéliales mais aussi les fibroblastes, les cellules musculaires, les neurones et bien d'autres types cellulaires ont été identifiés comme capables de détecter, puis de répondre activement à un changement d'environnement mécanique (Chen et al., 2008).

Par exemple, les cellules se déplaçant sur une surface solide par reptation (crawling) comme les fibroblastes sont sensibles aux gradients de rigidité du substrat et se déplacent préférentiellement vers des substrats plus rigides (Lo et al., 2000). La rigidité du substrat joue aussi un rôle prépondérant sur l'étalement (Engler et al., 2004; Solon et al., 2007), la contractilité (Allioux-Guérin et al., 2009; Mitrossilis et al., 2009) et même la différenciation des cellules souches (Engler et al., 2006). Dans cette dernière étude, Engler et ses collaborateurs ont cultivé des cellules souches sur des substrats dont la rigidité imitait celle de différents organes : cerveau, muscle, os et soumis ces cellules à des signaux biochimiques propres à la différenciation vers les types cellulaires correspondants. Après plusieurs semaines de culture, seules les cellules pour lesquelles les signaux biochimiques et la rigidité étaient en correspondance se sont différenciées (Engler et al., 2006).

La réponse mécanique des cellules a été étudiée à l'aide de différents montages expérimentaux. Dans toutes ces expériences, on applique une force à la cellule et on mesure la déformation résultante en amplitude et en phase. La différence entre les études porte sur le type cellulaire et sur la sonde utilisée pour appliquer la force. Ont été utilisés, une particule colloïdale dans un piège optique ou magnétique, le levier d'un AFM (atomic force microscope), l'aspiration d'une micropipette en verre, une aiguille en verre ou encore des microplaques (Mofrad, 2009). On peut voir en figure 1.1 une image tirée de l'étude menée par Fernández et al. (2006) où la mesure de la réponse élastique et visqueuse de fibroblastes est obtenue à l'aide de microplaques. Les dépendances du module à la fréquence et à la pré-contrainte sont montrées en figure 1.1 (Fernández et al., 2006). Malgré une dispersion cellule à cellule importante en terme de valeur absolue, un comportement universel se dégage : on observe une faible dépendance du module en fréquence mais une forte rigidification sous contrainte selon la loi d'échelle $G \sim G_0(\sigma/\sigma_c)^x$ avec $x = 1$.

Une des difficultés rencontrées avec un système vivant comme les cellules est de faire la part entre la réponse passive de l'échantillon, c'est à dire la réponse viscoélastique et la réponse active. Ces processus actifs peuvent avoir plusieurs origines, notamment en fonction de la fréquence à laquelle on sonde la cellule. Sur l'échelle de temps de la minute, il semble que la cellule a une réponse d'origine biochimique permettant une réorganisation de ses points d'adhésion focaux. Au temps court, l'étude de Mitrossilis et al. (2010) a montré que les cellules sont capables de s'adapter à un changement de rigidité de leur environnement en moins de 0.1 seconde. Cette réponse étant beaucoup trop rapide pour que les cascades biochimiques s'activent, elle est attribuée à une réponse mécanique impliquant la machinerie d'actomyosine.

Plusieurs modèles mécaniques ont été proposés pour la cellule, on peut les classer selon deux approches : ceux qui considèrent la cellule comme un milieu continu et ceux ayant

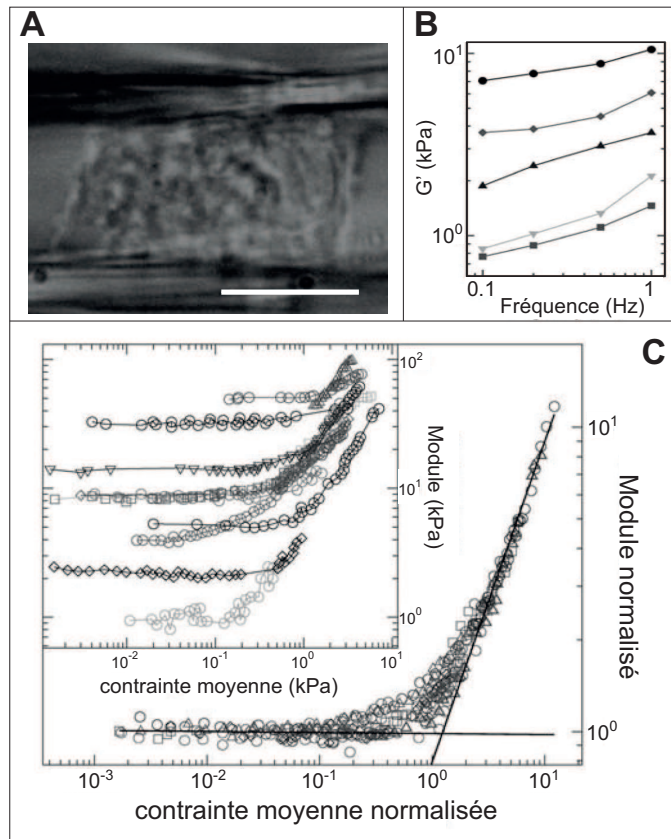


FIGURE 1.1 – A : Image d'un fibroblaste entre deux microplaques, barre d'échelle 5 μm ; B : Variation du module en fonction de la fréquence, chaque courbe représente une cellule ; C : Variation du module normalisé par le module à faible pré-contrainte en fonction de la pré-contrainte normalisée par la contrainte critique (ie : la contrainte à partir de laquelle on observe la rigidification), insert : variation du module en fonction de la pré-contrainte, d'après Fernández et al. (2006)

une vision discrète des différents éléments de la cellule. Les modèles milieu continu proposent une loi constitutive pour la cellule mais ne s'intéressent pas à sa microstructure. On peut citer le modèle poroviscoélastique (Noailly et al., 2008), celui du gel poreux (Satcher and Dewey, 1996), ou encore celui du matériau mou vitreux (Soft Glassy Material (SGM) en anglais) (Trepate et al., 2007). L'autre approche considère le cytosquelette de manière discrète. Dans le modèle de tenségrité, la forme et la stabilité de la cellule sont dues à un très grand nombre d'éléments discrets sous contrainte. Une structure maintenue par la tenségrité est stabilisée, non par la résistance des constituants mais par la répartition et l'équilibre des contraintes mécaniques dans la totalité de la structure (Wang et al., 1993).

La disparité des modèles peut paraître surprenante mais elle provient du fait qu'ils ne s'intéressent pas aux mêmes aspects de la question ni aux mêmes échelles de temps. N'étant pas en lien avec l'organisation microscopique de la cellule, ils se bornent à décrire sa réponse mécanique sans lien possible avec les processus actifs, mécaniques ou biochimiques. Pour mieux comprendre le rôle joué par cette organisation microscopique nous allons maintenant nous intéresser au cytosquelette.

1.2 Le cytosquelette

Pour qu'une cellule remplisse ses fonctions, il est important qu'elle soit capable de contrôler sa forme et sa rigidité. Ni la membrane plasmique qui est un objet très mou, ni le cytosol qui est un liquide n'y contribuent ; c'est le rôle du cytosquelette. Le terme cytosquelette désigne l'ensemble des structures formées par trois types de filaments : les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine (ou microfilaments). Ces structures ont en commun de s'étendre sur de grandes distances allant jusqu'à la taille d'une cellule, soit une dizaine de micromètres tout en étant formées par l'assemblage de protéines individuelles (des monomères) de taille classique pour des protéines, i. e. quelques nanomètres.

Intéressons-nous maintenant à chacun de ces filaments plus en détail, car bien qu'ils travaillent tous les trois de concert pour remplir les fonctions de stabilité mécanique, de migration ou de forme de la cellule, leur structure, leurs propriétés mécaniques et leurs rôles diffèrent.

1.2.1 Les microtubules

Les microtubules sont formés par l'assemblage d'un dimère de protéines appelé tubuline. Chaque microtubule contient treize protofilaments arrangés autour d'un axe central, chaque protofilament étant formé de plusieurs milliers d'unités. Cette architecture en tube creux confère aux microtubules une rigidité très importante qui leur permet d'aller d'un bout à l'autre de la cellule sans perdre leur orientation. Les microtubules sont polarisés, c'est-à-dire que leurs deux extrémités, l'une est appelée "plus" l'autre "moins", sont différentes en termes de cinétique de polymérisation/dépolymérisation et d'assemblage avec les protéines partenaires. Dans la cellule, ils servent notamment de rail pour le transport de structures sub-cellulaires. Le rôle de wagon est assuré par des vésicules et celui de locomotive par deux familles de moteurs moléculaires : les kinésines qui se déplacent en direction du bout plus et les dynéines qui se déplacent vers le bout moins.

1.2.2 Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont constitués de protéines longues et filamenteuses et regroupent en réalité un grand nombre de protéines différentes. Le point commun entre toutes ces protéines est une dynamique faible et des filaments non polaires. Les principaux exemples sont les lamines, les kératines, ou encore les neurofilaments. Ils servent notamment de câble longue distance pour assurer à la cellule une stabilité mécanique en lui évitant d'entrer dans le domaine de déformation plastique. En d'autres termes, ils permettent d'éviter à la cellule des dégâts irrémediables lors de grandes déformations.

1.2.3 Les microfilaments

Le monomère des microfilaments est une protéine nommée actine. Tout comme les microtubules, les filaments d'actine sont polarisés, les deux extrémités étant désignées *bout barbé* et *bout pointu*. Le microfilament est formé de deux protofilaments assemblés en hélice, ce qui le rend beaucoup plus souple qu'un microtubule. Dans certaines cellules, l'actine peut représenter jusqu'à 10% du poids total des protéines avec des concentrations dans le cytoplasme de l'ordre de la centaine de micromolaires (Hartwig and Shevlin, 1986). Elle est hautement conservée chez tous les eucaryotes avec, par exemple, des taux de similitude

Les protéines d'actine (que nous appellerons monomères ou actine-G par la suite) s'assemblent pour former un filament (actine-F). Les filaments ont un diamètre de 7 nm et sont constitués de deux protofilaments assemblés en structure hélicoïdale dextre dont le pas a pour longueur 37 nm.

Les filaments d'actine sont polarisés car le monomère est asymétrique au niveau moléculaire, c'est-à-dire qu'il peut réagir avec deux autres unités mais avec des constantes d'association différentes selon l'extrémité impliquée. On parle de bout pointu(-) et de bout barbé(+). Au cours de la polymérisation, le bout barbé d'un monomère ne peut se lier qu'avec le bout pointu d'un autre monomère et par conséquent, les filaments sont également polarisés ce qui se traduit par une différence de concentration critique. La concentration critique est la concentration en actine-G au-delà de laquelle les monomères s'ajoutent à l'extrémité en question. Cette propriété conduit à une dynamique de polymérisation originale dont nous détaillerons trois étapes possibles : la nucléation, l'élongation et le treadmilling.

1.3.2 Dynamique de polymérisation

La nucléation

L'assemblage des quatre premiers monomères formant un filament est appelé nucléation. On différencie cette étape du reste de la croissance, car c'est l'étape cinétiquement limitante. En effet, l'assemblage initial de deux puis trois monomères d'actine est instable et est donc rapidement désassemblé par l'agitation thermique. Ce n'est que lorsque le noyau compte quatre monomères qu'il peut être considéré comme stable (chaque monomère ayant à partir de là deux liaisons latérales). L'ajout d'un monomère étant un événement statistique dont la fréquence augmente avec la concentration en actine-G, plusieurs cas sont possibles. Si la concentration est faible, les trimères se désassemblent trop vite pour qu'un quatrième monomère ait le temps de s'ajouter et la polymérisation est bloquée. À plus forte concentration, le temps nécessaire pour former les noyaux donne lieu à un temps de latence dans la cinétique de polymérisation de l'actine (fig 1.3). En augmentant la concentration en actine-G, on peut réduire ce temps de latence mais pas le faire disparaître.

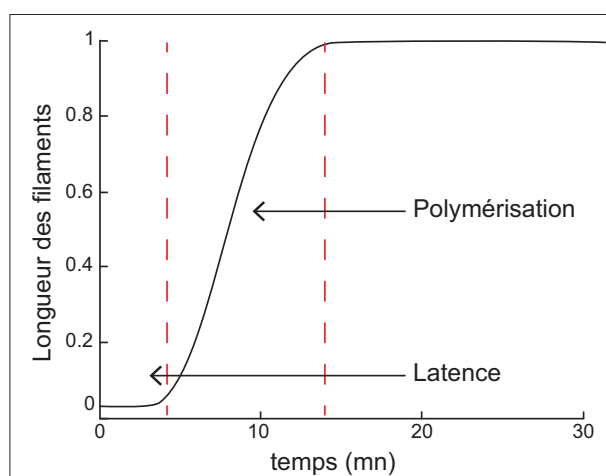


FIGURE 1.3 – Cinétique de polymérisation d'actine

La croissance et le treadmilling

Une fois le noyau formé, la croissance du filament s'effectue rapidement et l'incorporation des monomères aux filaments entraîne une diminution progressive de la quantité d'actine-G en solution. Tant que la concentration en monomères est supérieure à la concentration critique du bout pointu, le filament s'allonge par ses deux extrémités (fig 1.4.A : concentration C_1 et fig 1.4.B). Une fois que $C_{pointu}^c < [actG] < C_{barb}^c$ les monomères se désassemblent du bout pointu mais continuent de s'ajouter au bout barbé. Tant que l'ajout de monomères est plus rapide que la perte, le filament s'allonge et la quantité d'actine-G en solution diminue (fig 1.4.A : concentration C_2 et fig 1.4.C). La concentration à laquelle la vitesse d'ajout des monomères au bout barbé est égale à la vitesse de désassemblage au bout pointu est appelée la concentration d'équilibre (steady state)(Wegner, 1976). Lorsque $[actG] = C_{ss}$ le filament ne s'allonge plus car la vitesse de polymérisation est égale à la vitesse de dépolymérisation, mais il se "déplace" (fig 1.4.D), on parle du phénomène de treadmilling (tapis roulant en anglais). Ce qui est remarquable, c'est que bien que la longueur des filaments soit constante, il s'agit d'un état hors-équilibre puisqu'il y a consommation d'énergie sous forme d'hydrolyse de l'ATP lié aux monomères peu de temps après leur incorporation au filament. Cette transformation d'énergie chimique en énergie mécanique joue un rôle central dans les modèles de génération de force par les filaments d'actine (Alberts et al., 2008)

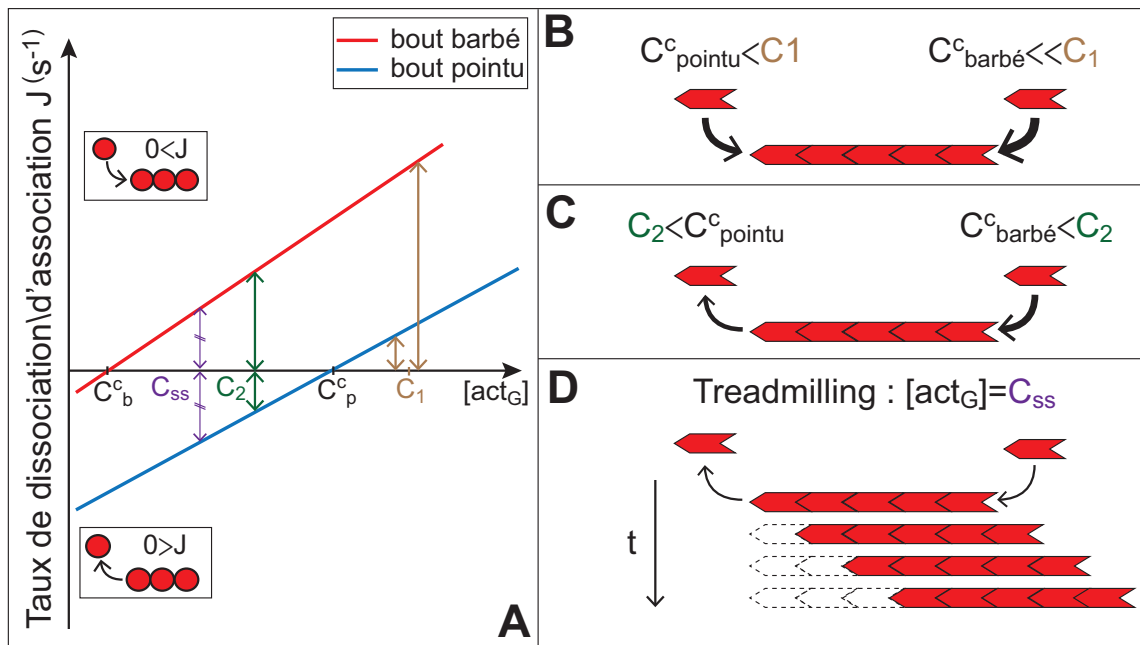


FIGURE 1.4 – Dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine. (A) Taux d'association/dissociation en fonction de la concentration d'actine (en rouge pour le bout barbé, en bleu pour le bout pointu). (B, C, D) Différentes situations de polymérisation/dépolymérisation en fonction de la concentration d'actine : (B) supérieure aux deux concentrations critiques (C) intermédiaire entre les deux concentrations critiques (D) égale à la concentration steady state (définie en violet en A).

1.3.3 Les partenaires de l'actine

In vivo l'actine interagit avec plusieurs centaines d'autres protéines que l'on appelle des ABP pour Actin Binding Proteins. A travers différents mécanismes, ces ABP ont principalement deux rôles : ajuster la dynamique de polymérisation de l'actine et organiser les filaments (Le Clainche and Carlier, 2008; dos Remedios et al., 2003; Uribe and Jay, 2009).

L'organisation des filaments se fait notamment grâce aux ABP de nucléation qui permettent de nucléer de nouveaux filaments à des concentrations bien plus basses que celle requise pour de la nucléation homogène. Les deux principaux membres de cette famille sont Arp2/3 et les formines. Arp2/3 se fixe sur un filament et fournit un site pour la polymérisation d'un nouveau filament. Les deux filaments sont liés entre eux avec un angle de 70° , ce qui donne un réseau de structure dendritique. Les formines allongent des filaments individuels, souvent organisés ensuite en fagots. Le mécanisme moléculaire d'action de la formine est encore en discussion.

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

Plusieurs familles d'ABP permettent à la cellule de contrôler la vitesse de croissance et la taille des filaments d'actine en modifiant la vitesse de polymérisation des monomères et donc les concentrations critiques et la concentration steady state. Les ABP déstabilisatrices/stabilisatrices se lient aux sous-unités d'un filament et modifient l'énergie de liaison des monomères entre eux. Les protéines stabilisatrices bloquent la dépolymérisation, on peut citer la tropomyosine. La principale protéine déstabilisatrice entraînant la dépolymérisation des filaments est la cofiline. Les ABP de coiffe, elles, se lient aux monomères se trouvant aux extrémités des filaments, bloquant ainsi l'ajout et le désassemblage de monomères. On peut citer par exemple gelsoline ou capZ. Il existe également des ABP dites de séquestration, qui ne se lient pas aux filaments mais aux monomères libres, ce qui bloque leur incorporation au filament (thymosine) ou l'accélère (profiline).

1.4 Les réseaux d'actine dans la cellule

In vivo, les filaments d'actine sont organisés en mésostructures pouvant générer ou/et résister à des contraintes mécaniques. L'arrangement des filaments et donc l'architecture des réseaux d'actine diffèrent selon la nature des ABP impliquées et la fonction de la structure au sein de la cellule (Fletcher and Mullins, 2010). Les ABP sont ainsi capables d'organiser les filaments d'actine sur des distances pouvant aller jusqu'à la taille de la cellule uniquement via des interactions à l'échelle moléculaire (Fletcher and Mullins, 2010). Savoir comment des processus d'auto-organisation microscopiques sont capables de générer des structures dynamiques, robustes et élaborées qui organisent et animent la cellule est une fascinante question encore très largement ouverte.

Ces structures possèdent plusieurs caractéristiques communes nécessaires à leur bon fonctionnement :

- elles sont hors équilibre puisqu'il y a consommation d'énergie sous la forme d'ATP, lors de la polymérisation de l'actine d'une part, et par des moteurs moléculaires présents dans le réseau d'autre part.
- elles sont hautement dynamiques et se réorganisent lors de phénomènes aussi divers que la migration cellulaire, l'endocytose (Smythe and Ayscough, 2006) ou encore la cytokinèse (Eggert et al., 2006).
- elles sont extrêmement robustes, par exemple, lorsque l'on traite des kératocytes avec du DMSO (molécule qui perméabilise les membranes) les cellules perdent leur forme pour devenir des sphères, mais il suffit de quelques minutes, après l'arrêt du traitement pour que la cellule retrouve sa morphologie initiale. (Keren et al., 2008)

Dans la suite nous discuterons des principales structures d'actine trouvées dans la cellule : le cortex cellulaire formé par un réseau d'actine isotrope et réticulé, les fibres de stress et les filipodes dans lesquels les filaments sont organisés en fagots et le lamellipode avec sa structure dense et branchée.

1.4.1 Cortex et fibres de stress

Le cortex cellulaire est une fine structure présente sous la membrane plasmique qui donne sa forme et son élasticité à la cellule. Dans le cortex, les filaments d'actine sont organisés en un réseau isotrope, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas d'orientation privilégiée et le réseau ressemble à une toile d'araignée aléatoire. Dans ces gels, les filaments d'actine ne sont pas seulement enchevêtrés mais ils sont chimiquement liés les uns aux autres par des ABP comme la filamine (Stossel et al., 2001) ou la spectrine (Machnicka et al., 2012). Le cortex contient également de la myosine II (Verkhovsky and Borisy, 1993) ; ce moteur moléculaire génère des contraintes internes qui, couplées aux propriétés non linéaires de l'actine, permettent à la cellule de contrôler sa rigidité. Par exemple, un amollissement de la cellule a été observé lorsqu'on la traite à la blebbistatin, un inhibiteur de la myosine II (Balland et al., 2005).

Quand on marque en fluorescence l'actine à l'intérieur d'une cellule, on observe nettement les fibres de stress (fig 1.5) : ce sont les structures très droites et très fluorescentes à l'intérieur de la cellule. Ce sont des fagots de filaments d'actine associés entre eux par de l' α -actinine et des myosines II. Généralement au moins une des extrémités de la fibre est attachée à la matrice extra-cellulaire via des protéines transmembranaires dans une structure appelée point d'adhésion focal. Les points d'adhésion focaux sont des sites de mécano-transduction (Riveline et al., 2001). L'activation des myosines II fait glisser les filaments de la fibre, ce qui génère une contrainte au niveau des points d'ancrage, permettant ainsi à la cellule de sonder localement son environnement mécanique (Fletcher and Mullins, 2010).

Les études biochimiques et génétiques ont permis d'identifier de nombreux acteurs protéiques participant à la vie du cortex et des fibres de stress. Une compréhension globale de ces deux structures demeure cependant à réaliser. En effet, la réponse mécanique de ces structures ne dépend pas seulement des partenaires impliqués mais également de la séquence d'application et des effets synergiques entre les protéines. Des questions critiques

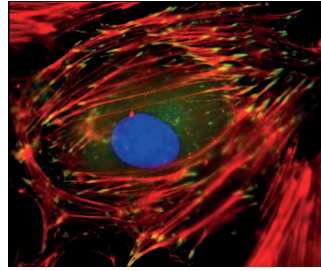


FIGURE 1.5 – Image d’une cellule, l’actine est marquée en rouge, les points d’adhésion focaux en vert et le noyau en bleu, d’après Lele et al. (2006)

pour la compréhension des propriétés viscoélastiques des cellules restent ouvertes (Fletcher and Geissler, 2009) . Les filaments sont-ils assemblés in situ ou importés depuis une autre zone de la cellule? Qu’est ce qui déclenche la transition entre réseau isotrope et fibres de stress? Comment s’effectue cette transition ?

1.4.2 Les structures de la migration cellulaire

La mise en place des structures de migration est mieux comprise. Pour migrer, une cellule se polarise et forme des mésostructures faites d’actine au niveau de son front avant : le lamellipode et les filipodes. L’initiation de la polarisation se fait via l’activation de cascades biochimiques impliquant, entre autres, la famille de Rho-GTPases (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Cela conduit à une redistribution drastique des composants du cytosquelette menant à un enrichissement localisé de la membrane plasmique en actine-F et en ABP. Bien que la plupart des cellules forment ces deux structures simultanément, certaines comme les kératocytes mettent l’accent sur le lamellipode, alors que les cellules dendritiques sont dominées par la formation de filipodes (fig 1.6.A).

Dans ces deux structures, les bouts barbés (donc à croissance rapide) des filaments d’actine font face à la membrane plasmique (fig 1.6.B). Ils sont, sans intervention de moteur moléculaire, à l’origine de la génération des forces qui permettent de repousser la membrane plasmique vers l’avant. Parallèlement, un flux rétrograde d’actine s’établit entre le lamellipode et le reste de la cellule (Welch, 1997).

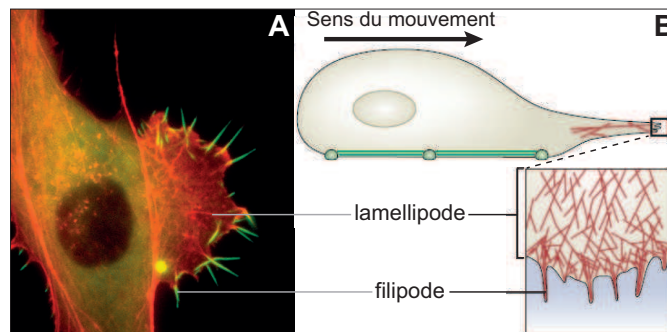


FIGURE 1.6 – A : Image d’une cellule, en rouge l’actine et en vert les filipodes. D’après Han et al. (2007). B : Représentation schématique d’une cellule en migration. D’après Mattila and Lappalainen (2008).

Le lamellipode

On parle de structure en feuille pour décrire le lamellipode, car il s'étend sur la largeur de la cellule, soit plusieurs microns mais il n'a pas plus de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur (Abercrombie, 1980). A l'intérieur, on trouve un réseau dendritique d'actine extrêmement dense, de l'ordre de 1200 filaments/ μm^2 (Abraham et al., 1999; Schaub et al., 2007) dont les filaments sont liés entre eux par des liaisons en Y. Le bout pointu de chaque filament est attaché à un autre filament et le bout barbé (donc le bout à croissance rapide) fait face à la membrane plasmique (Svitkina et al., 1997).

Ce branchement en Y a la particularité d'avoir un angle constant, de l'ordre de 70° . C'est au niveau du branchement que se trouve un complexe protéique qui a soulevé un très grand intérêt au cours des quinze dernières années : le complexe Arp2/3. Ce complexe lie le bout pointu du filament dit 'fille' sur le côté du filament dit 'mère', faisant office de protéine de réticulation (Blanchoin et al., 2000). Cependant, contrairement aux protéines de réticulation dont nous avons parlé jusqu'à présent comme l' α -actinine ou la fascine, Arp2/3 ne réticule pas a posteriori deux filaments déjà formés mais nucléé le nouveau filament sur le côté d'un filament préexistant. L'angle de 70° entre les filaments mère et fille entraîne la formation d'un gel à architecture dendritique (Mullins et al., 1998) (fig 1.7) .

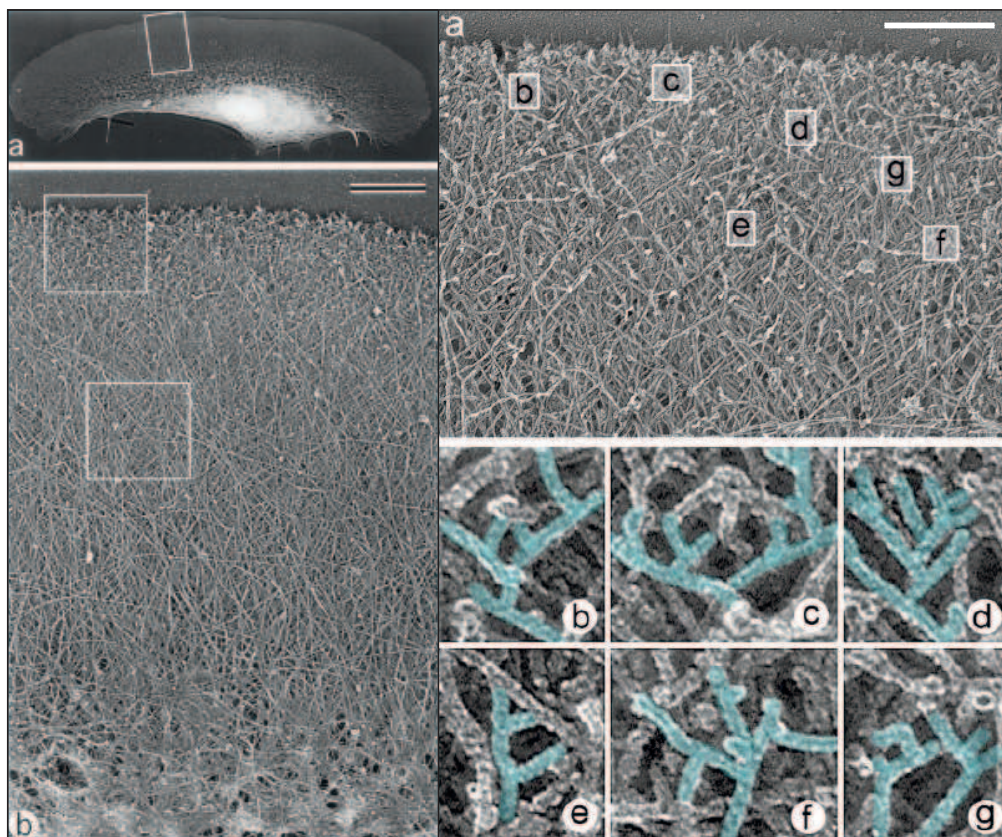


FIGURE 1.7 – Images de microscopie électronique du lamellipode d'un kératocyte. A gauche, a, Vue d'ensemble; b, Zoom sur le carré dessiné en a, barre d'échelle 1 μm . D'après Svitkina et al. (1997). A droite, a, Front avant de la structure; b-g Zoom sur les zones indiquées en a, faisant apparaître les différents points de branchement, barre d'échelle 0.5 μm . D'après Svitkina and Borisy (1999).

Arp2/3 étant activé de manière transitoire par la protéine N-WASP, elle-même activée au niveau de la membrane, la création de nouveaux filaments ne peut avoir lieu que dans une zone bien définie du cytoplasme. C'est par ce mécanisme que la cellule localise la polymérisation d'un gel d'actine à l'avant du lamellipode. La croissance de ce réseau génère des forces capables de pousser vers l'avant la membrane cellulaire sans avoir recours à des moteurs moléculaires. Si le mécanisme exact de génération de force reste encore largement soumis à débat, on peut cependant citer les modèles du Brownian ratchet (Peskin et al., 1993; Mogilner and Oster, 2003), le modèle autocatalytique (Carlsson, 2003) qui lie la génération de force et la croissance des filaments individuels. Plus récemment, un modèle entropique a été proposé à partir d'expériences utilisant un montage expérimental voisin de celui de cette thèse (Brangbour et al., 2011)

Bien que Arp2/3 soit au cœur de la formation du réseau dendritique, d'autres protéines y jouent un rôle de premier plan. Nous reviendrons largement sur les différentes protéines et mécanismes permettant *in vitro* l'assemblage d'un réseau d'architecture dendritique dans le chapitre 3.2.

Les filipodes

Les filipodes sont des structures en forme de doigt se trouvant à l'avant du lamellipode, larges de 100 à 300 nm et longues de 10 à 40 μm (Welch and Mullins, 2002). Ils sont remplis de filaments d'actine associés en fagots compacts. La croissance rapide des doigts est assurée par des protéines de la famille des formines qui se lient au bout barbé et accélèrent la polymérisation (Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002). Mécaniquement, un filipode doit supporter des forces importantes en compression selon son grand axe. Celles-ci sont liées à la déformation et à la courbure de la membrane cellulaire. Pour éviter le flambement du fagot, les filaments d'actine sont réticulés après leur polymérisation par des protéines de réticulation rigides (fig 1.8), notamment la fascine pour augmenter la limite de flambement d'Euler (Bausch and Kroy, 2006) .

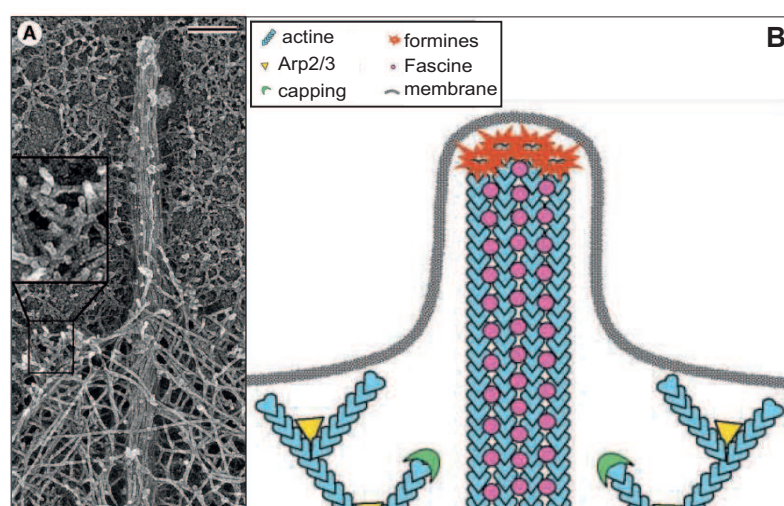


FIGURE 1.8 – A : Image de microscopie électronique d'un bourgeon de filipode issu du lamellipode d'un kératocyte, B : Représentation schématique, barre d'échelle 0,2 μm . D'après Svitkina et al. (2003)

Beaucoup de questions se posent encore à propos de ces structures, et notamment sur leur rôle. On leur attribue celui d'antenne pour la chemotaxie, la présence d'intégrine non liée mais activée à leur surface leur permettrait de sonder les sites d'adhésion propices à la formation ultérieure de points d'adhésion focaux. Ils serviraient également de tentacule au macrophage pour agripper les pathogènes avant de les phagocyter (Mattila and Lappalainen, 2008). La nucléation de ces structures est, elle aussi, soumise à débat : les filaments le composant sont-ils physiquement issus du lamellipode (Svitkina et al., 2003), certains filaments se retrouvant mis en fagot suite à une interaction stabilisatrice de la membrane (Liu et al., 2008) ? Ou s'agirait-il de structures formées de novo suite à une cascade biochimique impliquant notamment certains composants de la super famille des Rho GTPase (Steffen et al., 2006) ?

Chapitre 2

Mécanique des réseaux de polymères

Dans ce chapitre, nous commencerons par nous intéresser aux matériaux polymères en général en décrivant les grandeurs physiques qui les caractérisent d'un point de vue macroscopique et d'un point de vue microscopique. Nous présenterons ensuite les modèles théoriques développés pour modéliser leur réponse mécanique. D'une part les modèles "classiques", développés pour les polymères ayant une élasticité de type caoutchoutique ($L > L_p$, avec L_p la longueur de persistance du filament). D'autre part les modèles plus récents qui décrivent la réponse élastique de polymères biologiques qui sont semi-flexibles ou rigides, pour lesquels $L \sim L_p$ et $L \ll L_p$. Enfin, nous comparerons ces modèles théoriques aux nombreuses expériences menées sur des gels d'actine polymérisés en solution et nous présenterons les deux expériences qui, avant ma thèse, s'étaient intéressées à la réponse mécanique de gels d'actine polymérisés au contact d'une surface pour laquelle $L \ll L_p$.

2.1 Introduction

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

Les polymères du quotidien sont pour la plupart issus de la transformation du pétrole via des procédés pétrochimiques lourds. Les monomères sont constitués d'un squelette carboné auquel viennent s'ajouter d'autres atomes comme l'oxygène, l'hydrogène et l'azote qui forment des groupements appelés fonction, conférant aux matériaux macroscopiques des propriétés extrêmement variées. On peut citer : le polyéthylène, le polypropylène, le polychlorure de vinyle, le polystyrène. Notons qu'il existe aussi quelques exemples de polymères synthétiques non organiques comme le silicone.

Parmi ces polymères, la catégorie des élastomères présente un comportement mécanique original d'origine entropique : l'élasticité caoutchoutique. Il se caractérise par la capacité qu'ont ces matériaux de pouvoir être étirés plusieurs centaines de fois sans subir de dommage permanent. Une courbe contrainte déformation schématisée est donnée en figure 2.1.A. Après un court domaine d'élasticité linéaire (1) la déformation augmente de plusieurs centaines de pour cents avec une faible augmentation de la contrainte (2) pour finir par une augmentation subite et brutale (3). L'origine de ce comportement mécanique est en lien direct avec la microstructure de ces matériaux. En effet, ils sont faits de chaînes

flexibles ; au repos elles adoptent donc une configuration en pelote. La déformation éloigne les extrémités des chaînes, ce qui conduit à leur débobinage. Lorsqu'ils sont près de leur pleine extension, les polymères opposent une forte résistance à la déformation qui conduit à une augmentation brutale de la contrainte (fig 2.1.B). Cependant tant que les chaînes ne sont pas brisées, elles reprendront leur configuration initiale après relâchement de la contrainte. Nous reviendrons sur le modèle de la chaîne idéale ultérieurement.

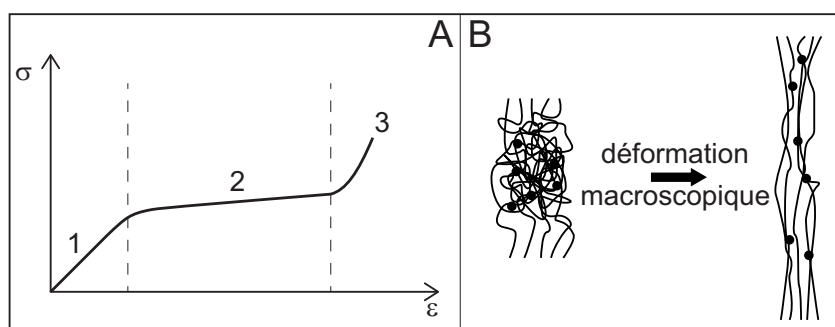


FIGURE 2.1 – A : Courbe contrainte déformation typique d'un polymère caoutchoutique ; B : Schéma de l'évolution de la microstructure d'un polymère caoutchoutique durant la déformation.

La biologie compte également un grand nombre de polymères. On peut citer la fibrine, le collagène, la vimentine ou encore l'actine. L'une des principales différences entre polymères synthétiques et biologiques est qu'une grande partie de ces derniers sont des filaments dits semi-flexibles qui, compte tenu de leur rigidité, ne peuvent pas se mettre en pelote et sont seulement légèrement courbés entre les points d'intersection du réseau. Cela a pour conséquence que, lors de la déformation, leur réserve de longueur est faible et qu'ils atteignent rapidement leur pleine extension, ce qui se traduit par une rigidification importante des matériaux même à petite déformation (fig 2.2) (Storm et al., 2005).

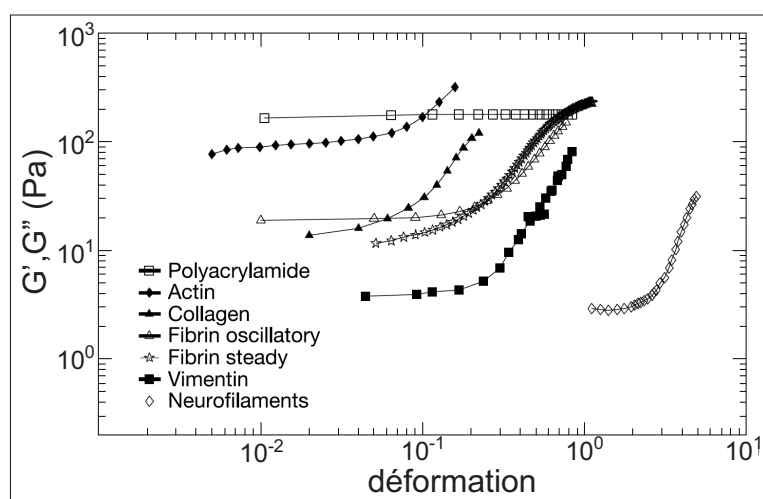


FIGURE 2.2 – Evolution du module de cisaillement avec la déformation des polymères biologiques et un polymère synthétique d'après Storm et al. (2005).

2.1.1 Description macroscopique

Il existe plusieurs constantes mécaniques associées à un matériau permettant de caractériser sa réponse élastique. Parmi les plus utilisées, on peut citer le module de Young, le coefficient de Poisson, le module de cisaillement, le coefficient de compressibilité, le premier coefficient de Lamé. Les efforts de modélisation et de mesure de chaque étude ne portent pas nécessairement sur la même constante. Cependant, lorsque l'on s'intéresse à un solide homogène et isotrope dans le cadre de la mécanique linéaire (ie à petites déformations), la connaissance de deux des ces constantes donne accès à toutes les autres via des formules circulaires (voir annexe A).

Les grandeurs dont nous reparlerons par la suite sont :

- Le module de Young (E) : coefficient de proportionnalité entre la contrainte appliquée (σ) et la déformation (ϵ) lorsque l'on soumet un matériau à une traction ou une compression uni-axiale telle que

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (2.1)$$

Typiquement les métaux ont un module de l'ordre du gigapascal alors que les élastomères, qui se déforment plus facilement, ont un module de Young de l'ordre du mégapascal.

- Le module de cisaillement (G) : Coefficient de proportionnalité entre la contrainte appliquée (τ) et la déformation (γ) obtenue lorsque l'on soumet un matériau à un cisaillement (fig 2.3) tel que :

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (2.2)$$

- Le coefficient de Poisson (ν) : il traduit la capacité d'un matériau à changer de volume lorsqu'il est soumis à un effort de traction ou de compression. La valeur de ce coefficient peut aller de -1 à 0.5. Pour les matériaux conventionnels, il est cependant compris entre 0 (matériaux parfaitement compressibles) et 0.5 (matériaux incompressibles).

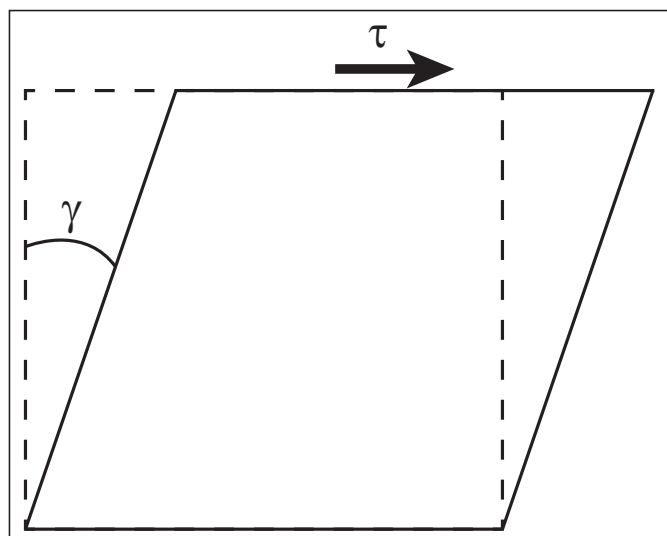


FIGURE 2.3 – Application d'une force τ générant un cisaillement γ .

2.1.2 Description microscopique

Une chaîne polymère a deux longueurs caractéristiques : une longueur totale notée L (longueur de contour) et une longueur de persistance notée L_p . La longueur de persistance traduit la rigidité d'une chaîne. En effet il s'agit de la longueur au-delà de laquelle le mouvement d'une extrémité du filament n'a pas de conséquence sur l'orientation de l'autre extrémité. En termes plus mathématiques : la longueur de persistance est définie comme la longueur d'arc au delà de laquelle la corrélation entre la direction des angles tangents est perdue dans un espace à trois dimensions (Landau and Lifstiz, 1980). L_p est donc une caractéristique propre à chaque polymère. Par exemple, l'actine a une longueur de persistance de l'ordre de 10 μm alors que celle de l'ADN ne sera que de 0.5 nm et celle d'un polymère synthétique de l'ordre de quelques monomères. La longueur de persistance dépend de nombreux paramètres, mais on imagine facilement que, par exemple, plus la liaison entre les monomères est forte, plus il sera difficile de plier une chaîne. Le module de flexion (κ) est lié à la longueur de persistance par : $\kappa = L_p kT$ avec k la constante de Boltzmann et T la température.

On classe les polymères en fonction du rapport L/L_p :

- $L \gg L_p$: les filaments sont souples ; l'agitation thermique les conduit à adopter une forme de pelote
- $L \ll L_p$: les filaments sont rigides et s'apparentent à des bâtons indéformables
- $L \sim L_p$: les filaments sont semi-flexibles : bien qu'ayant la forme de bâtons, ils sont soumis à des ondulations thermiques.

A ces deux longueurs caractéristiques du filament viennent s'ajouter celles caractérisant le réseau formé : la taille de la maille (ξ) et une distance caractéristique (L_c). La taille de la maille est la distance moyenne entre deux filaments. Pour un réseau de filaments rigides ou semi-rigides, De Gennes et al. (1976) donnent $\xi \sim (ac)^{0.5}$, avec c la concentration en monomères et a la taille du monomère. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement pour des réseaux de filaments d'actine (Sackmann et al., 1986). La distance caractéristique L_c est la distance sur laquelle une chaîne dans un réseau se déforme. Elle joue un rôle central dans la compréhension de la réponse mécanique des réseaux polymères et sa définition demeure encore aujourd'hui délicate. En première approximation, on peut l'assimiler à la distance entre enchevêtrements (L_e) pour les polymères non réticulés et à la taille de la maille pour des polymères fortement réticulés (Bausch and Kroy, 2006). Dans un réseau de polymère, c'est cette longueur, L_c , qu'il faut comparer à la longueur de persistance, L_p , pour déterminer si les filaments se déforment entre deux points d'interaction comme des filaments souples, semi-flexible, ou rigides. L'objet de la partie suivante est de décrire les modèles permettant de relier les déformations microscopiques à la réponse macroscopique du réseau de polymères.

2.2 Modèles

Le but des modèles mécaniques est de lier la réponse mécanique macroscopique aux propriétés microscopiques des matériaux. En d'autres termes, d'exprimer les grandeurs macroscopiques E , G etc en fonction des grandeurs microscopiques L , L_p , ξ , L_c ou L_e . Pour ce faire, on égalise la densité d'énergie élastique (e_{el}) macroscopique et celle emmagasinée par les filaments du réseau.

D'un point de vue macroscopique, le calcul est direct $e_{el} = \text{contrainte} \cdot \text{déformation}$ donne, via les relations 2.1 et 2.2

$$E_{el} \sim E \cdot \epsilon^2 \sim G \cdot \gamma^2 \quad (2.3)$$

D'un point de vue microscopique, le calcul de e_{el} est plus compliqué. En effet, se pose la question de comprendre comment est stockée l'énergie élastique à l'échelle des filaments. Les modèles propres aux trois catégories de filaments : flexibles, semi-flexibles et rigides, ont chacun une approche différente. Ils supposent cependant tous que la déformation est affine, c'est-à-dire qu'elle est homogène dans tout le réseau. Nous verrons que cette hypothèse peut être discutée à l'aide de simulations.

2.2.1 Chaîne souple $L_p \ll L$

Pour des raisons historiques, les chaînes ayant une longueur de persistance très petite devant la longueur de leurs contours ont été les premières à être modélisées. En effet, il s'agit de modèles simples se rapportant à un matériau utilisé par l'homme depuis près de 3 000 ans : le caoutchouc. Le polymère constituant ce matériau se prête bien au modèle le plus simple : de grandes chaînes souples ($L_p \ll L$) obéissant au modèle de la marche aléatoire (fig 2.4). Ce modèle a comme hypothèses que la direction du maillon $n+1$ n'est pas contrainte par la direction du maillon n , qu'il n'y a pas de condition de non recouvrement des maillons entre eux et que la chaîne est si molle qu'il n'y a pas de changement d'énergie associé à un changement de courbure. Pourquoi, dans ces conditions, le caoutchouc a-t-il un comportement élastique ?

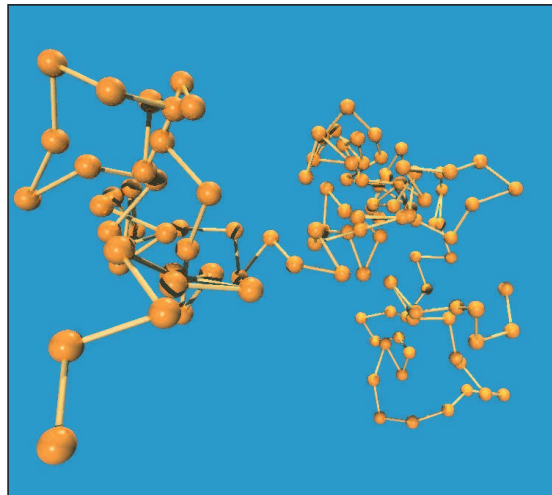


FIGURE 2.4 – Représentation d'une marche aléatoire

Modèle de la chaîne idéale

Pour une chaîne libre, isolée et soumise à l'agitation thermique, la déformation se traduit par un éloignement de ses extrémités. Cet éloignement tend les chaînes ce qui entraîne une diminution du nombre de configurations accessibles. L'élasticité caoutchoutique est d'origine entropique car le retour à l'état initial du matériau est dû à une augmentation du désordre de ses constituants.

On décrit l'espace des configurations accessibles d'un polymère à l'aide de la distance bout à bout (ie à vol d'oiseau) entre les deux extrémités d'une chaîne (notée R). Conformément à la théorie du marcheur aléatoire en l'absence de force extérieure : $\langle R \rangle = 0$ et $\langle R^2 \rangle = N \cdot a^2 = L \cdot a$ avec N le nombre de monomères, a la taille d'un monomère et L la longueur de la chaîne dépliée.

Une molécule libre a accès à toutes les configurations possibles (notées Ω_0). Lorsqu'on lui impose une condition d'éloignement de ses extrémités $\langle R \rangle \neq 0$, le nombre de configurations satisfaisant ce critère diminue ($\Omega_1 < \Omega_0$). L'apparition d'une force de rappel a pour origine une diminution de l'entropie du système telle que :

$$\Delta S = k \cdot \log \left(\frac{\Omega_1}{\Omega_0} \right) \quad (2.4)$$

Il s'agit maintenant de construire un réseau constitué de chaînes libres. On se place dans le cas parfait où la déformation est affine (ie la même pour tous les constituants du réseau) et où il n'y a pas d'interactions entre chaînes. Pour un réseau de n chaînes idéales, la variation d'entropie est égale à la somme de la variation d'entropie des constituants.

A l'aide de considérations thermodynamiques, on obtient l'expression de la force f appliquée au solide de dimension macroscopique L_{sol} pour le déformer de λ .

$$f = \frac{nkT}{L_{sol}} \cdot \lambda \quad (2.5)$$

On obtient la contrainte en divisant l'expression de la force par l'aire de la surface de contact (L_{sol}^2) et on dérive par rapport à la déformation pour obtenir l'expression du module de Young.

$$E = \frac{3nkT}{V} \quad (2.6)$$

avec n le nombre de filaments (chaque segment de filament entre deux points de réticulation est comptabilisé), V le volume du solide.

Bien que ce modèle décrive un système idéal, il capture deux propriétés essentielles du caoutchouc : une augmentation de la rigidité avec la température due à une augmentation de l'agitation thermique et une variation du module proportionnelle au nombre de filaments : plus un polymère est réticulé, plus le matériau est rigide.

Modèle de reptation

Le modèle de la chaîne idéale suppose une collection de filaments isolés dont on néglige les interactions. Il est en effet extrêmement difficile de paramétrer un tel problème. Pour contourner la difficulté de modéliser un environnement topologiquement complexe pour chaque polymère, la notion de tube de reptation a été introduite dans les années 70 par Pierre-Gilles de Gennes.

Le raisonnement est le même que pour le modèle de la chaîne idéale, l'énergie élastique du matériau est égale à l'énergie élastique d'une chaîne moyenne multipliée par le nombre de chaînes. La nouveauté vient du fait qu'on représente les polymères environnant le filament test de manière continue à travers l'image d'un tube dont les extrémités sont ouvertes mais

les parois infranchissables (fig 2.5). Les fluctuations thermiques du filament test et donc l'espace des configurations accessibles sont directement liés au diamètre du tube. Les modèles élastiques utilisant cette représentation lient le diamètre moyen du tube à l'entropie du filament, aux propriétés statistiques du réseau comme la densité de monomères ou la longueur de maille et aux propriétés du polymère comme la longueur de persistance.

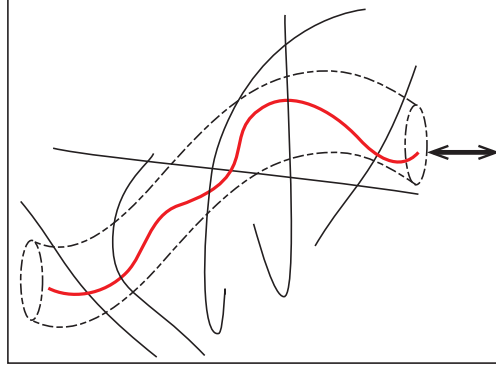


FIGURE 2.5 – Représentation d'un filament prisonnier de son tube prison (filament rouge). Le tube prison est formé par les autres filaments du réseau (filaments noirs)

Pour les réseaux réticulés ou enchevêtrés, une loi d'échelle pour le module de Young est proposée pour les chaînes infiniment flexibles :

$$E = \frac{kT}{(N_e \xi^3)}$$

avec N_e le nombre de monomères entre points d'enchevêtrement (de Gennes, 1979; Doi and Edwards, 1988).

Contrairement au modèle de la chaîne idéale et sa représentation des molécules sous forme de pelote, la métaphore du tube permet d'imaginer un filament ayant plutôt l'aspect d'un spaghetti mi-cuit c'est-à-dire dont $L_p \sim L_c$. Cette idée a permis la construction de modèles pour des gels d'actine.

2.2.2 Chaîne semi-flexible ($L_p \sim L$)

Modèle du tube

Dans un matériau au repos, les filaments fluctuent librement à l'intérieur de leur tube, ils ont donc accès à un certain nombre de configurations. Lors de la déformation, les tubes se déplacent, ce qui perturbe leur arrangement relatif. Le volume du matériau restant constant, c'est le volume des tubes qui diminue, entraînant ainsi une diminution du nombre de configurations accessibles. Chaque nouvelle collision réduit l'espace des conformations du filament test, ce qui coûte à l'énergie libre F de l'ordre de kT . F étant proportionnel au module de cisaillement G on aboutit à :

$$G = kT \xi^{-2} L_e^{-1} \quad (2.7)$$

(Isambert and Maggs, 1996)

Compte tenu des propriétés des réseaux de filaments semi-flexibles enchevêtrés et de considérations géométriques, on peut lier le diamètre d du tube virtuel à L_p , L_e et ξ la taille de maille :

$$L_e^3 = d^2 L_p \quad (2.8)$$

(Odijk, 1983)

$$d = \frac{\xi^2}{L_e} \quad (2.9)$$

(Frey et al., 1999)

Ces relations permettent de lier la distance caractéristique L_e difficile à évaluer à une propriété caractéristique du réseau ξ et une caractéristique du filament L_p :

$$L_e = (\xi^{4/5} \cdot L_p^{1/5}) \quad (2.10)$$

en reprenant les équations 2.10, 2.7 et $\xi \sim (ac)^{-0.5}$, on obtient (Isambert and Maggs, 1996; Frey et al., 1999) :

$$G \sim kTL_p^{-1/5}(ac)^{7/5} \quad (2.11)$$

Dans ce modèle entropique, le module du réseau est peu dépendant de la longueur de persistance des filaments ($l_p^{1/5}$) mais davantage de la concentration en monomères ($c^{7/5}$). Ce modèle sera comparé à des mesures expérimentales dans le chapitre suivant.

Modèle d'élongation entropique

Un autre modèle proposé par Mackintosh and Janmey (1995) se base sur la distance caractéristique L_c comme donnée centrale du problème. La déformation macroscopique se caractérise par un angle θ . Comme on suppose la déformation affine, la réponse élastique du réseau est attribuée à une tension appliquée uniformément à chaque chaîne que l'on étire d'une longueur $\delta L = \theta \cdot L_c$.

Les filaments étant semi-flexibles, ils sont sensibles à l'agitation thermique. Dans l'état relaxé, leurs configurations sont influencées par deux effets antagonistes : l'entropie qui veut minimiser la distance entre les extrémités du filament, et la rigidité du filament qui veut en minimiser la courbure. Lorsque l'on déforme un filament, on s'écarte de son état d'équilibre d'où l'apparition d'une force rappel τ .

Son Hamiltonien s'écrit alors :

$$H = \frac{1}{2}\kappa(\nabla^2 u(x)) + \frac{1}{2}\tau(\nabla u(x))^2 \quad (2.12)$$

avec $u(x)$ les déformations transverses (fig 2.6). Grâce au théorème d'équipartition on peut remonter à une expression de la force de rappel τ :

$$\tau \sim \frac{kTL_p^2}{L_c^4} \delta L \quad (2.13)$$

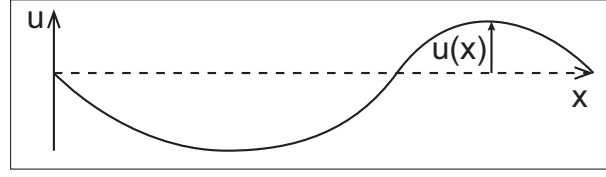


FIGURE 2.6 – Paramétrisation d'un filament semi-flexible.

D'un point de vue microscopique, cette force est appliquée sur une surface ξ^2 , de plus comme $\delta L = \theta L_c$, on obtient :

$$G \sim kTL_p^2 \xi^{-2} L_c^{-3} \quad (2.14)$$

Dans un polymère densément réticulé, on peut supposer que la distance caractéristique sur laquelle s'applique la déformation est la distance entre points de réticulation, qui est aussi la taille de la maille qui via l'expression $\xi \sim (ac)^{-0.5}$ nous donne :

$$G \sim kTL_p^2 (ac)^{5/2} \quad (2.15)$$

Pour un polymère enchevêtré, il est plus approprié de choisir $L_c = L_e$. L'expression de L_e pour un polymère semi-flexible est donnée par le modèle du tube (eq 2.10) qui, ajouté à l'équation $\xi \sim (ac)^{-0.5}$, donne :

$$G \sim kTL_p^{7/5} (ac)^{11/5} \quad (2.16)$$

Ces deux expressions sont très voisines et certains groupes choisissent la seconde expression pour des réseaux d'actine réticulés, considérant que les ponts réticulants se forment là où les polymères entrent en contact, c'est à dire à une distance L_e les uns des autres (Gardel et al., 2004).

On voit que le modèle d'élongations entropiques prévoit une dépendance plus importante du module à la concentration par rapport au modèle du tube exposé dans la partie précédente. On verra dans la partie 2.3.1 que le modèle d'élongations entropiques fonctionne bien pour les polymères réticulés mais que le modèle du tube capture mieux les propriétés élastiques d'un réseau enchevêtré.

2.2.3 Polymère rigide $L_p \gg L$

Avant de continuer plus avant, il est intéressant de noter l'équivalence qui existe entre une diminution de la longueur d'interaction entre les filaments du réseau (L_c) et une augmentation de la longueur de persistance des filaments (L_p). Dans les deux cas, le filament test voit son orientation de plus en plus contrainte par son environnement et est de moins en moins sensible aux fluctuations thermiques aux échelles de taille considérées. Lorsque l'on est dans les cas où $L_p \gg L_c$, le filament peut même être considéré comme une barre rigide ne subissant pas de fluctuation thermique (modèle à 0 K). Une barre a deux moyens d'accommoder une déformation : la flexion ou l'extension/compression. Contrairement aux modèles vus jusqu'à présent, ces deux modes de déformation sont d'origine enthalpique puisque c'est la déformation du lien entre monomères qui est à l'origine de la force de rappel.

Modèle de flexion

Pour une poutre encastrée à une extrémité et libre à l'autre, de longueur L , de module de Young E_f et de moment quadratique I , il est possible de calculer la flèche (ΔL) résultant de l'application d'une force F perpendiculairement à l'extrémité libre de la poutre. (fig 2.7)

$$F = \frac{E_f I \Delta L}{L^2} \quad (2.17)$$

$\kappa = E_f I$ est appelé module de flexion.



FIGURE 2.7 – Définitions des grandeurs pour une poutre encastrée à une extrémité et soumise à une force perpendiculaire

Un réseau fait de filaments rigides peut se représenter comme un filet rigide et irrégulier en trois dimensions. Les filaments étant distribués dans toutes les directions, le module de Young du réseau E suit la même loi d'échelle que le module de Young d'une maille. En divisant la force par la surface d'une maille (ξ)² et en remplaçant L par la longueur caractéristique du réseau sur laquelle un filament se déforme (L_c) on remonte à la contrainte σ subie par une maille :

$$\sigma = \frac{\kappa}{L^2 \xi^2} \frac{\Delta L}{L_c} \quad (2.18)$$

La loi d'échelle pour le module de Young est donnée par l'équation $\sigma = E \cdot \epsilon$ avec $\epsilon = \Delta L / L_c$. De plus pour un filament microscopique $\kappa = k T L_p$ ce qui nous donne comme loi d'échelle :

$$E \sim k T L_p L_c^{-2} \xi^{-2} \quad (2.19)$$

(Joly-Duhamel et al., 2002)

Pour un réseau densément réticulé, on peut prendre comme précédemment $L_c = \xi = (ac)^{-0.5}$. On obtient alors une variation quadratique du module en fonction de la concentration en actine (Satcher and Dewey, 1996).

Dans un réseau peu connecté, les déformations en flexion s'appliquent seulement sur certains filaments (déformation non-affine). La dépendance du module aux longueurs caractéristiques ($L_c L_p \xi a$) n'est pas changée, mais un préfacteur dépendant de la connectivité du réseau apparaît (Broedersz et al., 2011). Ce préfacteur devient très faible près de la transition de percolation quand le nombre de filaments supportant la contrainte décroît.

Modèle d'extension/compression

En première approche, l'extension/compression d'une barre homogène de rayon peut être modélisée par la loi du ressort : $F = k_r \Delta L$ avec k_r la constante de raideur égale à $E_f a^2 L^{-1}$.

Comme pour le modèle de flexion $E_f I = k T L_p$ donc $E_f = k T L_p a^{-4}$ (pour une poutre circulaire $I \sim a^{-4}$)

$$F = k T L_p a^{-2} \frac{\Delta L}{L} \quad (2.20)$$

Avec $\Delta L/L$ la déformation macroscopique, la loi d'échelle du module de Young du réseau est donnée par l'expression de la force divisée par la surface ξ^2 .

$$E \sim k T L_p a^{-2} \xi^{-2} \quad (2.21)$$

La dépendance par rapport à la longueur de persistance des filaments est moins forte dans les modèles enthalpiques (dépendance linéaire) que dans le modèle entropique (dépendance quadratique). On peut également constater que le modèle d'extension/compression enthalpiques ne fait pas intervenir de longueur caractéristique (L_c) sur laquelle la déformation se produit (Head et al., 2003a).

Se demander dans quel régime de déformation se trouve le réseau revient à se poser la question de savoir si énergétiquement parlant, il sera moins coûteux pour le matériau polymère de se déformer en pliant ses filaments (eq 2.19), en les étirant mécaniquement (eq 2.21) ou en les étirant entropiquement (eq 2.16). Autrement dit doit-on considérer les filaments comme des barres rigides ou comme des filaments fluctuants? Pour s'intéresser à la transition entre les différents régimes mécaniques en fonction des paramètres microscopiques comme L_c , L_p ou ξ , certains auteurs ont eu recours à des simulations numériques.

2.2.4 Simulations

Ces simulations numériques sont faites sur des réseaux dits "mikado" par analogie au jeu où on laisse tomber un fagot de baguettes qu'on essaie ensuite de désenchevêtrer (Wilhelm and Frey, 2003; Head et al., 2003a). Le principe des simulations 2D est de générer un réseau isotrope en disposant aléatoirement des barres rigides sur un plan. On soumet ensuite le plan à une déformation macroscopique et des algorithmes cherchent la déformation des filaments qui minimise l'énergie élastique globale du système (fig 2.8.A). Les intersections entre les barres sont désignées comme points de réticulation permanents ce qui a comme conséquence que les filaments ne peuvent pas glisser les uns par rapport à l'autre. On se trouve donc dans le cas d'un réseau réticulé.

Dans les simulations 2D, Head et al. (2003b) ont mis en avant des changements de régime en fonction de la longueur moyenne des filaments et de la densité de points de réticulation. La figure 2.8.B montre le schéma du diagramme de phase.

Examinons ce diagramme pour en avoir une compréhension qualitative. La ligne en trait plein représente la limite de percolation, en-dessous les filaments ne sont pas assez connectés pour former un gel et le module élastique est nul. En partant d'un réseau se déformant via un mode d'extension/compression (1 sur la figure 2.8), déplaçons-nous vers la gauche en supprimant des points de réticulation (L_c augmente). Lorsque l'on arrive dans le domaine entropique (2), le filament a une réserve de distance liée aux fluctuations thermiques suffisante pour qu'il puisse se déformer sans être lui-même contraint mécaniquement. La transition entre ces deux régimes s'effectue à $L_c = a^{2/3} \cdot L_p^{1/3}$. En réduisant la taille des

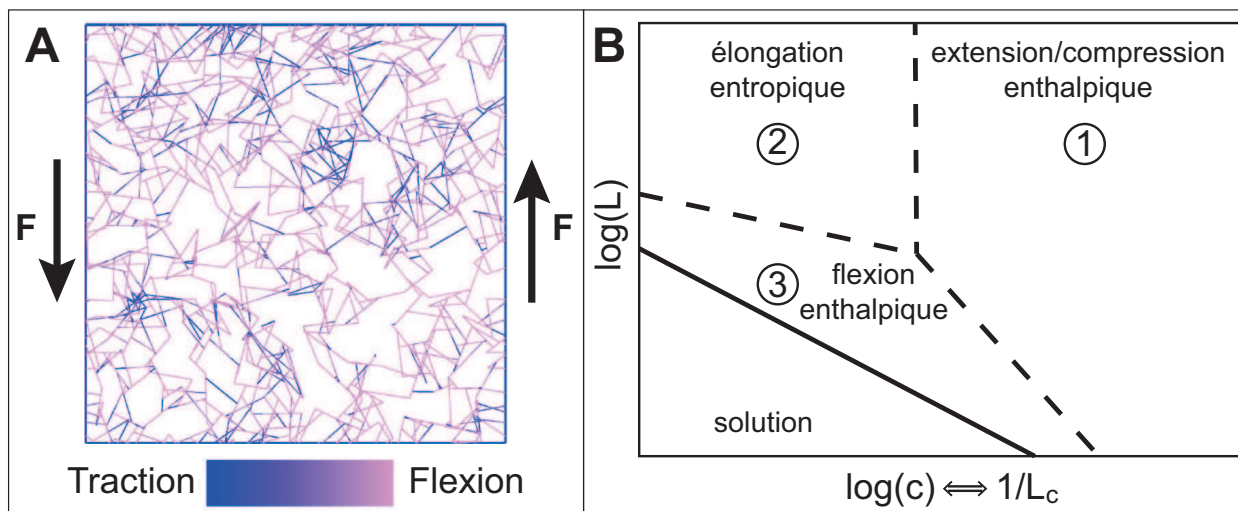


FIGURE 2.8 – Exemple de simulation d’un réseau déformé après minimisation de l’énergie, les filaments en traction sont en bleu et ceux en flexion sont en rose ; B : Diagramme des modes de déformation d’un réseau d’actine en fonction de la longueur moyenne des filaments (en 2D elle est équivalente à la connectivité) et de la concentration (en 2D elle est équivalente à l’inverse de la densité de réticulation) d’après Head et al. (2003b)

filaments on diminue la connectivité du réseau tout en restant au-dessus de la limite de percolation (3), la charge ne sera alors supportée que par quelques chaînes traversant l’échantillon en entier. Lors de la mise sous contrainte, seuls ces filaments se déforment. On parle dans ce cas de déformations non affines qui se trouvent être dominées par de la flexion puisque les couples s’exerçant sur les chaînes deviennent importants. Lorsque l’on se déplace vers la droite en augmentant le nombre de points de réticulation, on supprime des degrés de liberté aux filaments jusqu’au moment où la flexion d’un unique filament entraîne une déformation très importante de beaucoup d’autres. Il est donc préférable pour le réseau de revenir à des déformations affines sous forme d’extension/compression.

Simulation 3D

Les simulations en 2D ont été un premier pas dans l’identification des régimes dominants mais ils ne sont pas complètement satisfaisants. Il est notamment impossible de séparer la densité de filaments de la densité de points de réticulation et la connectivité de la longueur des filaments. Une récente étude réalisée par Broedersz et al. (2011) utilise le même principe, mais cette fois en trois dimensions. Cette étude confirme l’existence d’une zone de flexion non affine ainsi que d’une zone de traction affine (fig 2.9). Elle met également en évidence une zone où le système comprend à la fois de la flexion et de la traction.

Dans ce cas le module élastique obéit à la loi :

$$G_{mix} \sim kT a^{-0.9} \xi^{-2} L_p L_c^{-1.1} \quad (2.22)$$

Les paramètres déterminant les transitions de régime sont la connectivité qui représente le nombre de brins par point de réticulation et le rapport entre la rigidité longitudinale et transversale des filaments, autrement dit la longueur à partir de laquelle il est plus facile de déformer un filament en flexion plutôt qu’en traction/compression. Nous concluerons

cette partie par un tableau récapitulatif des différents modèles exposés ici (table 2.1).

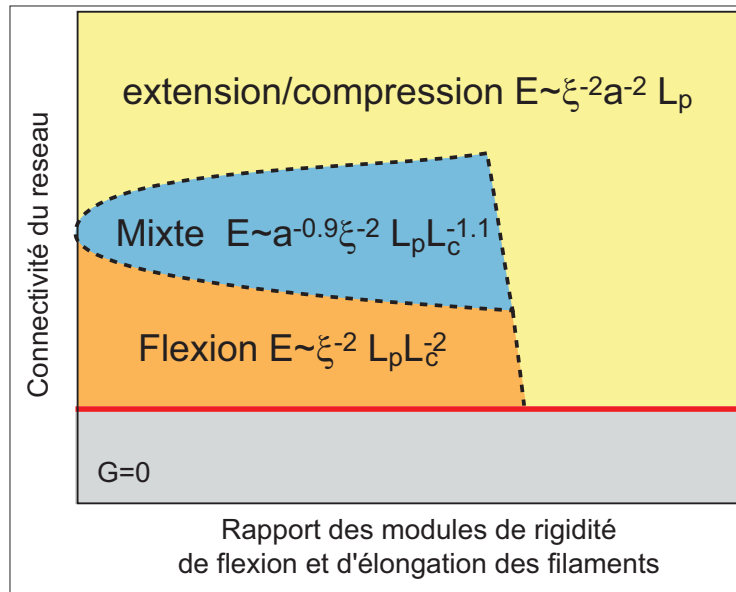


FIGURE 2.9 – Diagramme des modes de déformation d'un réseau d'actine en fonction de la connectivité et du rapport de la rigidité des filaments lorsqu'on les déforme en flexion et en extension/compression. D'après Broedersz et al. (2011)

modèle	De Gennes	Tube	élongations entropiques			flexion	extension/compression		mixte
ref		(Isambert)	(McKintosh)			(Joly-Duhamel)	(Head)		(Broedersz)
longueurs	$L_p \ll \xi$	$L_p \sim \xi$ et L_c			$L_p \gg L_c$				
lien	enchev/ret	enchevêtré	enchev/ret	réticulation					
origine	entropie				enthalpie				
$E/kT \sim$	$Ne^{-1}\xi^{-3}$	$L_e^{-1}\xi^{-2}$	$L_p^2 L_c^{-3} \xi^{-2}$			$L_p L_c^{-2} \xi^{-2}$		$L_p a^{-2} \xi^{-2}$	$a^{-0.9} L_c^{-1.1} \xi^{-2}$
Hypothèses		$L_e = L_p^{1/5} \xi^{4/5}$	$L_c = L_e = L_p^{1/5} \xi^{4/5}$	$L_c = \xi$	$L_c \neq \xi$	$L_c = \xi$	$L_c \neq \xi$		
c		$c^{7/5}$	$c^{11/5}$	$c^{5/2}$	c	c^2	c	c	c

TABLE 2.1 – Récapitulatif des modèles mécaniques proposés pour les gels de filaments semi-flexibles présentés dans le chapitre 2. De haut en bas, le nom du modèle, le rapport des longueurs caractéristiques, le type de gel, l'origine de la réponse élastique, la loi d'échelle du module de Young divisé par l'énergie thermique, l'hypothèse sur l'architecture du réseau et la dépendance à la concentration en monomères d'actine

2.3 Expériences de mécanique sur gels d'actine reconstitués

2.3.1 Gels assemblés en solution

L'intérêt soulevé par les gels d'actine dans les années 90 a deux origines. D'une part la mise en avant par les biologistes de la richesse de ces systèmes au travers des innombrables rôles joués par l'actine dans la cellule. D'autre part l'actine est l'un des rares représentants de la classe des filaments dits semi-flexibles. Ces filaments étant capables de former des gels à faible fraction volumique ils sont un sujet d'étude à part entière de la physique des polymères.

Une solution contenant de l'actine monomérique en assez grande concentration et dont les conditions salines sont appropriées subit une transition sol-gel. Cela signifie que la viscosité augmente avec le temps et qu'une fois celle-ci stabilisée, le système présente une réponse viscoélastique à la déformation. Cette transition est due à la polymérisation des filaments au sein de la solution qui, bien qu'étant en fraction volumique très faible, forment un réseau tridimensionnel allant d'un bout à l'autre de l'échantillon, conférant ainsi au système ses propriétés élastiques.

Les gels d'actine polymérisés en solution ont été les premiers systèmes *in vitro* permettant d'effectuer des mesures mécaniques sur de l'actine cellulaire. Il existe cependant une grande différence entre les structures trouvées *in vivo* et les gels formés *in vitro* : les gels dans la cellule sont denses, organisés et polarisés alors que ceux polymérisés en solution sont peu denses, organisés aléatoirement et isotropes (Fig 2.10). Tirer des conclusions sur la mécanique du cytosquelette d'actine à partir des mesures sur les gels en solution n'est donc pas direct. Le but est plutôt de comprendre quelles sont les grandeurs caractéristiques du système et comment les différentes ABP affectent la morphologie et la mécanique du réseau. L'avantage des mesures *in vitro* est que l'on peut contrôler finement la composition du milieu et ainsi étudier des systèmes de complexité croissante : de l'actine seule, de l'actine réticulée par une ABP, de l'actine réticulée par une ABP ou des ABP en présence de moteurs moléculaires.

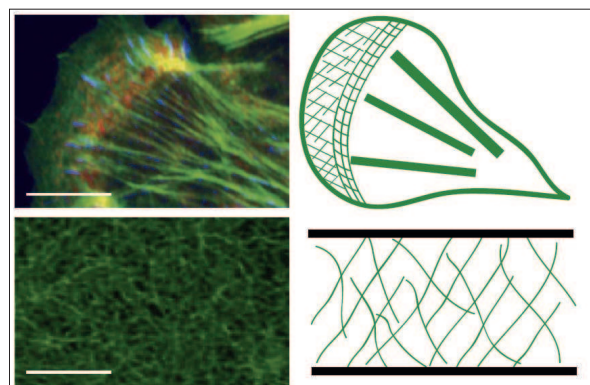


FIGURE 2.10 – Image de fluorescence à gauche (l'actine apparaît en vert) et les schémas correspondants à droite. En haut un réseau de filaments d'actine se trouvant dans une cellule et en bas un gel d'actine polymérisé *in vitro*. Dans la cellule on distingue le lamellipode, le lamella, les fibres de stress et le cortex, alors que l'actine *in vitro* se présente comme un gel homogène. Les barres d'échelle font 10 μm . D'après Stricker et al. (2010)

Les deux techniques de mesures mécaniques les plus utilisées pour les gels d'actine sont la rhéologie et la micro-rhéologie :

- Les mesures de rhéologie sont réalisées en polymérisant le gel directement dans l'entrefer d'un rhéomètre en géométrie cylindrique coaxial ou plan plan. On applique ensuite une contrainte sinusoïdale de petite amplitude et on mesure la déformation (ou inversement) ce qui permet de connaître le module cisaillement du matériau via la relation $\tau = G\gamma$. On peut également s'intéresser à l'effet de la pré-contrainte sur le module de cisaillement en appliquant une déformation constante à laquelle on ajoutera une déformation sinusoïdale de petite amplitude (on mesure alors le module de cisaillement différentiel ($K = \frac{d\sigma}{d\epsilon}$)).
- En micro-rhéologie, on filme le mouvement brownien de particules colloïdales incorporées au gel avant la polymérisation. La diffusion des particules étant perturbée par la présence des filaments environnants, il est possible en mesurant les déplacements quadratiques moyens des particules et grâce au théorème de Stokes-Einstein généralisé, de remonter au module de cisaillement et au module de perte du matériau. La micro-rhéologie à un point utilise les fluctuations de particules individuelles et la micro-rhéologie à deux points analyse les corrélations des fluctuations entre deux particules. Bien que ces méthodes soient moins intrusives que la rhéologie (il n'y a pas de force appliquée), les résultats sont souvent plus sujets à caution car le mouvement des billes est très sensible à l'hétérogénéité locale du réseau (Schmidt et al., 2000).

Solution d'actine enchevêtrée

Les études sur la rhéologie des filaments d'actine ont débuté au milieu des années 1980. Une controverse de plusieurs années a principalement porté sur la valeur du module élastique des gels enchevêtrés. En 1998 un consensus a finalement été atteint donnant une valeur voisine de l'ordre de 1 Pa pour une concentration de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ et des fréquences de 0,1 à 1 Hz (Xu et al., 1998).

Des expériences de rhéologie (Hinner et al., 1998) ont étudié la variation du module de cisaillement d'un gel d'actine en fonction de la longueur et donc du degré d'enchevêtrement des filaments. On peut voir en figure 2.11.A la variation du module avec la longueur des filaments, celui-ci augmente rapidement au-dessus d'une valeur seuil. Les auteurs de cette étude concluent que cette augmentation est trop brutale pour être attribuée au mode interne des polymères eux-mêmes (modèle de la chaîne idéale et polymère flexible) et qu'il faut faire appel aux effets collectifs proposés par la théorie du tube et au caractère semi-flexible des filaments pour l'expliquer (section 2.2.1). De fait, on peut voir sur la fig 2.11.B que, comme prédit par le modèle proposé par Isambert and Maggs (1996), le module varie bien comme la concentration en actine à la puissance $7/5$.

Gardel et al. (2003) se sont également intéressés aux réseaux d'actine enchevêtrés, cette fois avec des mesures de micro-rhéologie. Ils montrent que bien que les mesures à un point soient très sensibles au rapport taille des particules sur taille de maille, la micro-rhéologie à deux points est, elle, bien en accord avec les résultats de rhéologie classique. La différence entre les deux méthodes vient de la nature du couplage entre les particules et les modes d'excitation des filaments et renseigne sur les longueurs caractéristiques en jeu dans le système. Rappelons que dans la théorie des tubes, la longueur d'onde des fluctuations des

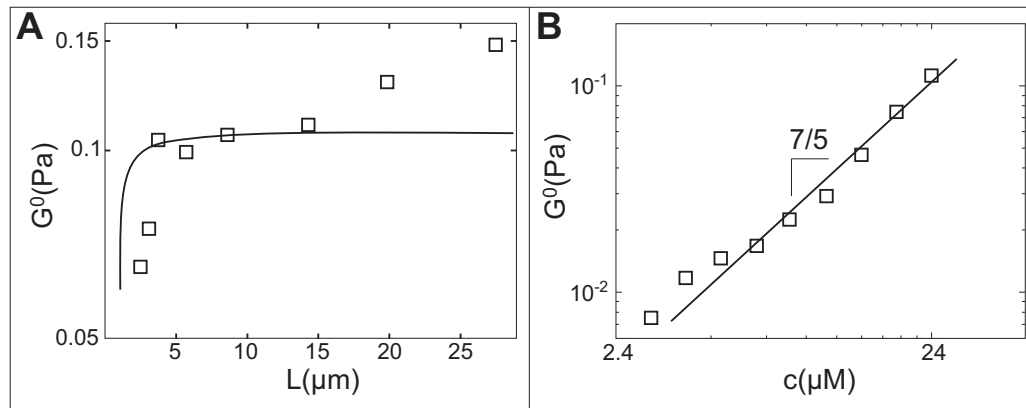


FIGURE 2.11 – A : Variation du module de cisaillement en fonction de la longueur des filaments pour un gel polymérisé à 24 μM d'actine ; B : Variation du module de cisaillement en fonction de la concentration en actine. D'après Hinner et al. (1998)

filaments est directement corrélée à la taille du tube prison, qui est elle-même liée à la distance entre enchevêtrements. Lors de la déformation, c'est la diminution de la taille des tubes et donc des longueurs d'onde accessibles aux fluctuations qui est à l'origine de la réponse élastique. La micro-rhéologie à un point n'étant sensible qu'aux fluctuations dont la longueur d'onde est du même ordre que la taille des particules, on constate que le module de cisaillement varie peu en fonction de la fréquence. Par contre, la micro-rhéologie à deux points est sensible aux fluctuations des filaments sur un spectre beaucoup plus large (les particules sont typiquement séparées d'une distance de 10 à 100 μm), le comportement de G en fréquence est donc identique à celui mesuré en rhéologie (fig 2.12.A).

La technique de micro-rhéologie à deux points permet également de calculer le coefficient de Poisson en comparant les corrélations transverses et longitudinales. La valeur moyenne est voisine de 0.5 (fig 2.12.B), les gels d'actine polymérisés en solution sont donc proches d'un matériau incompressible. Notons que bien que cette mesure soit très bruitée, il s'agit de la seule mesure du coefficient de Poisson de ce matériau.

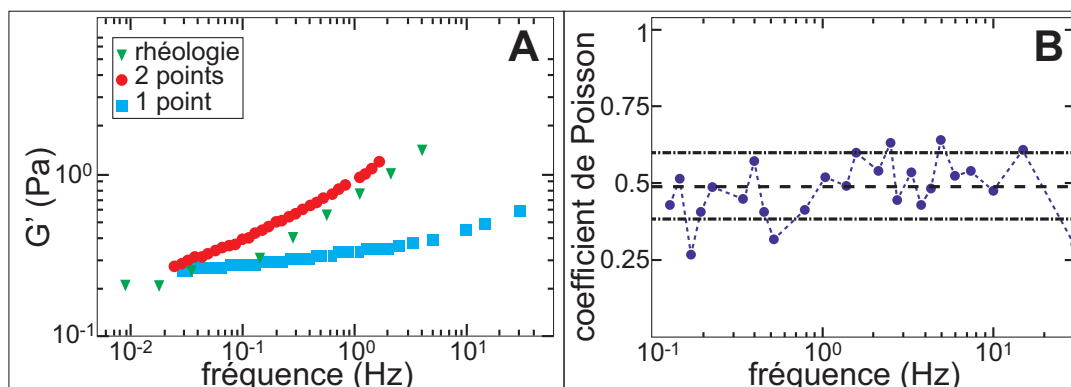


FIGURE 2.12 – A : Comportement en fréquence du module de cisaillement mesuré en rhéologie (triangle vert), micro-rhéologie à un point (carré bleu) et micro-rhéologie à deux points (cercle rouge) ; B : Coefficient de Poisson en fonction de la fréquence calculée à partir des mesures de micro-rhéologie à deux points. D'après Gardel et al. (2003)

La tenue mécanique d'un gel constitué de filaments semi-flexibles enchevêtrés est donc bien expliquée par le modèle du tube dans lequel la limitation des fluctuations thermiques des filaments fait suite à une diminution du volume des tubes lors de la déformation. La différence de module entre la plupart des cellules et les gels enchevêtrés étant de quatre ordres de grandeur, plusieurs équipes se sont intéressées à l'élasticité dans de gels constitués de filaments d'actine réticulés, potentiellement plus rigides.

Gel d'actine réticulé

Gardel et al. (2004) se sont intéressés à un gel d'actine réticulé par de la scruine. Il s'agit d'une protéine que l'on trouve dans les cellules spermatiques de *Limule* (Horseshoe crab). Elle se lie au monomère d'actine et une interaction non spécifique scruine-scruine lie les filaments d'actine entre eux. Les liens scruine-scruine étant très rigides, ils ne contribuent pas à la réponse élastique du gel. Cette étude s'intéresse à la variation de rigidité des gels en fonction de la concentration en actine et du rapport $R = [\text{protéine de réticulation}] / [\text{actine}]$.

Gardel et collègues tirent les conclusions suivantes : d'une part contrairement au gel constitué de polymères flexibles dont la rigidité varie peu avec la densité de réticulation, l'élasticité du gel d'actine varie fortement lorsque l'on fait varier l'un de ces deux paramètres. Par exemple, le module de cisaillement augmente de plus de trois décades lorsque le rapport R passe de 0.01 à 1 ($G_0 \sim R^2$) (fig 2.13.A). D'autre part, le réseau présente une forte rigidification sous contrainte (comportement non linéaire) même pour des déformations très faibles puisque le module de cisaillement différentiel augmente d'une décade lorsque la précontrainte passe de 1 à 10 Pa (fig 2.13.B).

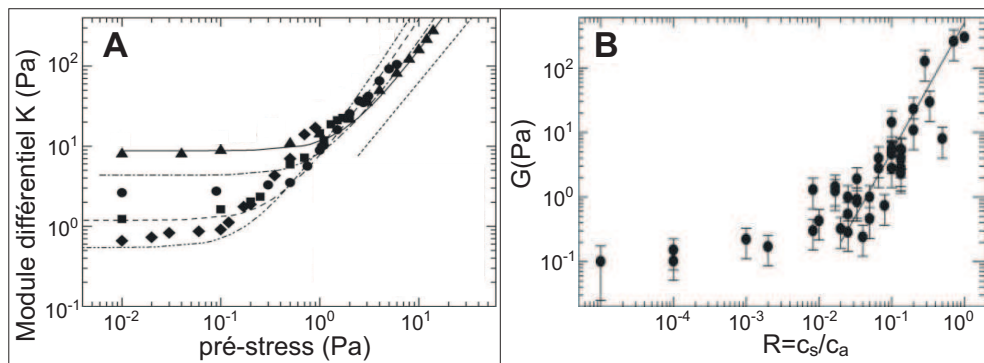


FIGURE 2.13 – A : Variation du module de cisaillement différentiel en fonction de la pré-contrainte pour des concentrations d'actine allant de $[act] = [29.4 - 8.33] \mu\text{M}$ et $R = 0.03$; B Variation du module de cisaillement à faible pré-contrainte en fonction de la concentration en protéine de réticulation pour un gel polymérisé à $11.9 \mu\text{M}$; d'après Gardel et al. (2004).

Ces auteurs expliquent ce comportement par la nature semi-flexible des filaments qui implique que la distance entre les points de réticulation est plus petite que la longueur de persistance ($L_c < L_p$). Ainsi les filaments sont suffisamment rigides pour être proches d'une représentation en barres rigides mais pas suffisamment pour que l'on puisse complètement négliger les fluctuations thermiques. Ces dernières "utilisant" une partie de la longueur des filaments, la distance à vol d'oiseau entre les points de réticulation est légè-

rement supérieure à la longueur totale de filaments. Lorsqu'on applique une déformation macroscopique, la distance entre les points de réticulation augmente, les filaments étant près de leur extension totale au repos, la diminution d'entropie est très brutale ce qui conduit à une rigidification du matériau même à petite déformation. Il s'agit du modèle des déformations affines proposé par Mackintosh and Janmey (1995) que nous avons vu précédemment. Cette interprétation est confirmée par la variation du module de cisaillement en fonction de la concentration telle que $G \sim [\text{actine}]^{2.5}$ (fig 2.14).

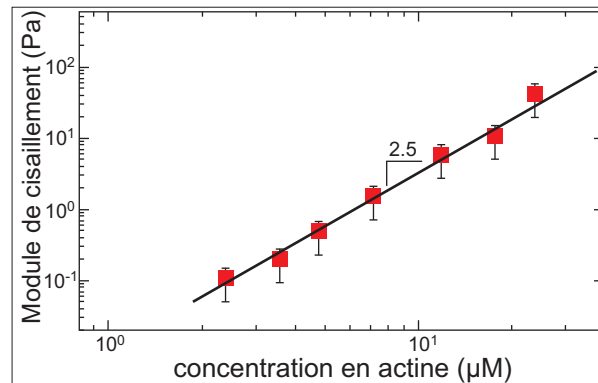


FIGURE 2.14 – Variation du module de cisaillement en fonction de la concentration en actine, d'après Gardel et al. (2004).

On peut voir sur la figure 2.15 que la présence de scruine dans le réseau n'entraîne pas qu'une rigidification mais également un changement d'architecture. En effet les protéines de réticulation se lient aux filaments pendant une durée déterminée avant de se détacher, permettant ainsi une réorganisation du réseau. Selon la nature et la concentration de la protéine de réticulation, les filaments d'actine sont soit répartis de manière homogène et isotrope, soit regroupés en fagots soit dans une situation intermédiaire. Expérimentalement, on constate que c'est principalement la taille de la protéine de réticulation qui fixe la phase dans laquelle sera le gel d'actine. Celles de petite taille telle que la fascine (Tseng et al., 2001) ou l'espine (Purdy et al., 2007) ont tendance à rapidement créer des fagots compacts d'actine alors que les plus grandes telles que l' α -actinine (Wachsstock et al., 1994), la flammine ou l'aniline (Kinoshita et al., 2002) induisent un comportement plus complexe : à faible concentration elles réticulent les filaments en réseau isotrope alors qu'à plus haute concentration, elle mènent à des phases de fagots ou des phases mixtes avec coexistence de fagots et d'un réseau isotrope.

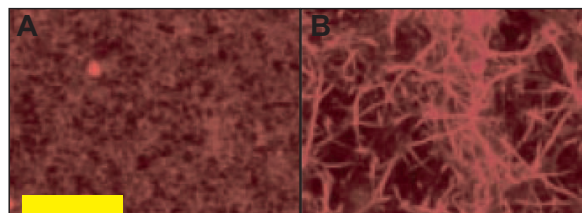


FIGURE 2.15 – Image en fluorescence de deux gels à la même concentration en actine (11.9 µM) en absence (A) ou en présence de R=0.5 de scruine (B). D'après Gardel et al. (2004), la barre d'échelle fait 3 µm

Pour s'affranchir des questions de morphologie du réseau, Tharmann et al. (2007) ont étudié les propriétés mécaniques de gel d'actine réticulé par de l'HMM (méromyosine lourde). Cette ABP est une partie de myosine qui, en l'absence d'ATP, réticule les chaînes sans entraîner de mise en fagots. Ce système a l'avantage de donner accès à une large gamme de rapports R .

Ils observent un changement de comportement du module en fréquence pour un rapport $R=0.005$ qu'ils interprètent comme la signature d'une évolution de longueur caractéristique du réseau. Lorsque la densité de points de réticulation augmente, la réponse mécanique n'est plus liée au confinement spatial des filaments par leur tube (L_e) mais à l'étirement des ondulations thermiques des filaments comme proposé par le modèle d'élongation entropique (L_c). Comme pour l'étude de Gardel et al. (2004) le module présente une variation proche de $c^{11/5}$.

En suivant l'évolution du module avec R , les auteurs constatent une variation en loi d'échelle telle que $G_0 \sim R^{1.2}$. Pour $R > 0.3$, ils observent une saturation du module qu'ils expliquent par le fait que L_c ne peut pas être plus petite que L_e ; lorsque tous les filaments proches l'un de l'autre sont liés ensemble, l'ajout de protéines de réticulation ne modifie plus la réponse mécanique.

Le comportement non linéaire du matériau est moins évident à interpréter. En effet on peut voir sur la figure 2.16 que dans le régime de rigidification, la pente des courbes G en fonction de la déformation varie selon R . L'absence de comportement universel n'est pas éclaircie. Deux explications ont été proposées : un décrochage des protéines de réticulation dû à une traction trop forte sur les filaments ou à un changement de mode de déformation graduelle avec la pré-contrainte (Tharmann et al., 2007).

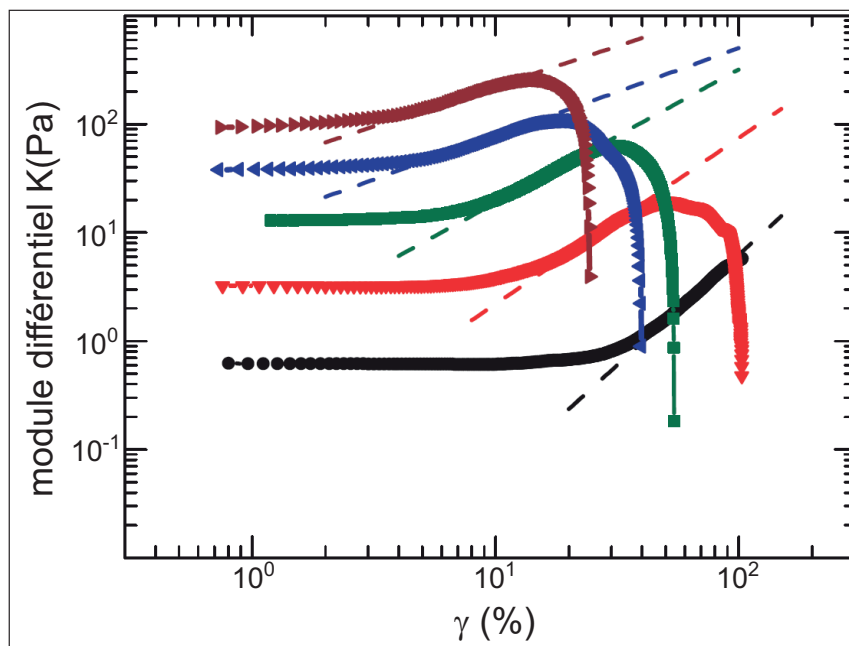


FIGURE 2.16 – Variation du module différentiel en fonction de la déformation, de noir à bordeaux $R=[0.0015, 0.0075, 0.038, 0.071, 0.14]$; d'après (Tharmann et al., 2007).

L'autre côté du spectre des morphologies de réseau a été étudié par Lieleg et al. (2007) qui se sont intéressés à la réponse mécanique d'un réseau d'actine dans lequel tous les filaments sont mis en fagots par une protéine que l'on trouve dans les filipodes : la fascine. Pour $R < 0.01$ l'absence de fagots se traduit par un module qui varie comme $c^{1.3}$, ce qui est cohérent avec les résultats pour un gel enchevêtré. Lorsque R passe de 0.01 à 0.5, le diamètre moyen des fagots augmente de 6 à 90 nm et le module de cisaillement varie comme $c^{2.4}$. Bien que cette valeur soit proche du modèle proposé par Mackintosh and Janmey (1995), les éléments structuraux de ce système ne correspondent pas aux hypothèses du ressort entropique. En effet le module de flexion d'une barre dépend de son rayon à la puissance 4, la mise en fagots se traduit donc par une rigidification très importante des constituants réduisant drastiquement leurs fluctuations thermiques. Ce raisonnement est en accord avec la comparaison de filaments test fluorescents dans les systèmes (actine + HMM) et actine + fascine (fig 2.17.A). Les auteurs expliquent la loi d'échelle du module en fonction de la concentration en actine par un nouveau modèle de "nonaffine floppy mode model" (Heussinger and Frey, 2006) qui correspond à une déformation des fagots en flexion. Expérimentalement ce mode de déformation s'accompagne d'une diminution du comportement non linéaire du gel (fig 2.17.B).

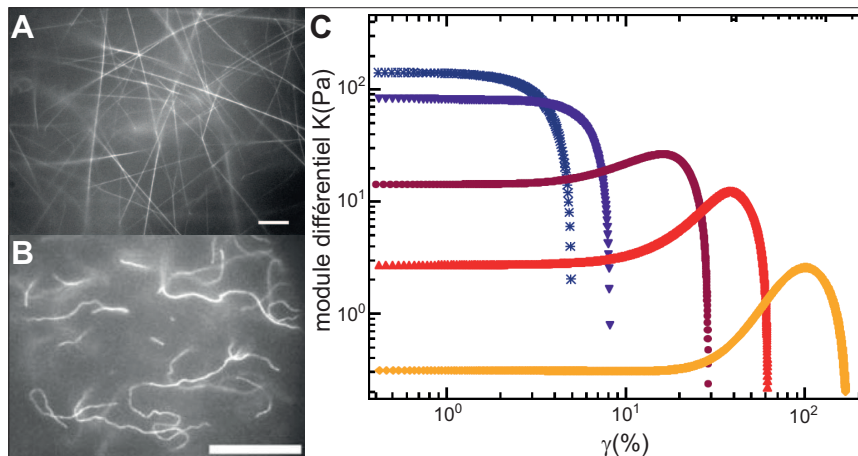


FIGURE 2.17 – A : Image de filaments fluorescents au sein d'un réseau contenant de la fascine ; B : Image de filaments fluorescents au sein d'un réseau contenant de l'HMM, d'après Tharmann et al. (2007) ; C : Variation du module différentiel en fonction de la déformation pour des gels contenant 0.4 mg/mL d'actine et une quantité croissante de fascine, de jaune à bleu $R=[0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5]$, d'après Lieleg et al. (2007).

Les trois systèmes que nous venons de mentionner atteignent typiquement un module de cisaillement de l'ordre de 100 Pa lorsqu'ils sont soumis à une forte pré-contrainte et en présence d'une forte concentration en protéines de réticulation, ce qui est encore un ordre de grandeur en dessous des valeurs mesurées in vivo. Gardel et al. (2006) ont étudié un système contenant de la filamine, qui lui atteint un module différentiel de 600 Pa lorsque la pré-contrainte est de 2000 Pa. La filamine est la protéine de réticulation la plus présente dans le cortex cellulaire. Sa grande flexibilité lui permet de promouvoir la jonction de filaments quelle que soit leur orientation. La grande rigidité des réseaux actine + filamine est attribuée à l'effet cumulé de la perte d'entropie par les filaments et par les protéines de réticulation lors de l'application de la pré-contrainte.

Visco-élasticité

Le module de perte (G'') d'un gel d'actine enchevêtré est un ordre de grandeur plus petit que le module de cisaillement et a la même dépendance en fréquence (fig 2.18.B). La présence de protéines de réticulation modifie ce comportement, notamment selon la vitesse d'attachement et de détachement des protéines de réticulation. Wachsstock et al. (1994) ont étudié un gel réticulé par la liaison biotine/avidine. Dans ce système, un certain pourcentage de monomères sont préalablement attachés de manière covalente à une biotine et l'introduction d'avidine (ou de streptavidine) après la formation du réseau lie les biotines suffisamment proches l'une de l'autre. Les filaments étant à présent attachés les uns aux autres, ils ne peuvent plus se déplacer, ce qui empêche tout réarrangement du réseau lors de la mise sous contrainte. Macroscopiquement, la réponse visqueuse de ces gels disparaît, ils se comportent comme un solide élastique quelle que soit la fréquence (la contrainte et la déformation sont alors en phase) (fig 2.18.A).

Pour les protéines de réticulation dont l'attachement est transitoire, le comportement est plus complexe. A haute fréquence la présence de protéines de réticulation diminue le module de perte et le comportement du gel se rapproche de celui de gel réticulé de manière permanente. En effet sur l'échelle de temps de la sollicitation, les protéines de réticulation n'ont pas le temps de se décrocher. A basse fréquence, le temps de vie de la liaison entre en jeu. Lors de la mise sous contrainte, le décrochage d'un lien permet le réarrangement des filaments et donc une relaxation des contraintes locales, qui conduit à une augmentation de la dissipation visqueuse (fig 2.18.B). La fréquence de coupure peut être liée aux constantes d'affinité de la protéine de réticulation (Wachsstock et al., 1993). Ces études montrent que c'est bien le mouvement de filaments via la théorie de la reptation qui est à l'origine de la réponse visqueuse des gels d'actine.

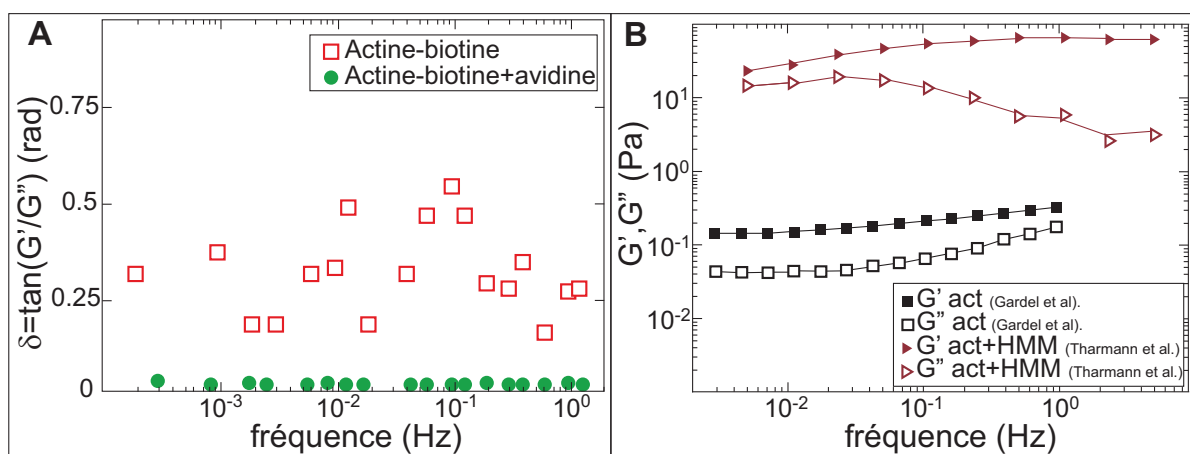


FIGURE 2.18 – A : variation du déphasage en fonction de la fréquence pour un gel d'actine polymérisé à $15 \mu\text{M}$ d'actine comprenant 2% d'actine biotinylée (carré) et pour un gel contenant 2% d'actine biotinylée et de l'avidine, d'après Wachsstock et al. (1994); B : Comparaison des modules d'un gel d'actine enchevêtré (Gardel et al., 2006) et d'un gel d'actine réticulé par de l'HMM (Tharmann et al., 2007)

Gel "actif"

On parle de gel actif lorsque celui-ci se trouve hors équilibre thermodynamique, c'est-à-dire lorsqu'il y a consommation d'énergie sous forme d'ATP. Par exemple c'est le cas en présence d'un moteur moléculaire, la myosine II, qui est constituée d'un corps et de plusieurs têtes capables de se lier au filament d'actine. En l'absence d'ATP, les têtes sont liées au filament et la myosine joue le rôle de protéine de réticulation. Par contre en présence d'ATP, l'hydrolyse fournit l'énergie pour que les têtes se déplacent et génèrent une force. Si les têtes sont liées à un seul filament, la myosine se déplace le long de celui-ci, mais si elles sont liées à deux filaments dont la position dans l'espace est fixée par des protéines de réticulation, il en résulte une mise en tension de ces filaments (fig 2.19.A).

De cette mise en tension résulte une diminution de la longueur de filament disponible pour la fluctuation thermique : la myosine crée des contraintes internes qui vont avoir le même effet que la pré-contrainte externe sur la rigidité d'un gel (fig 2.19.B) (Koenderink et al., 2009; Mizuno et al., 2007)).

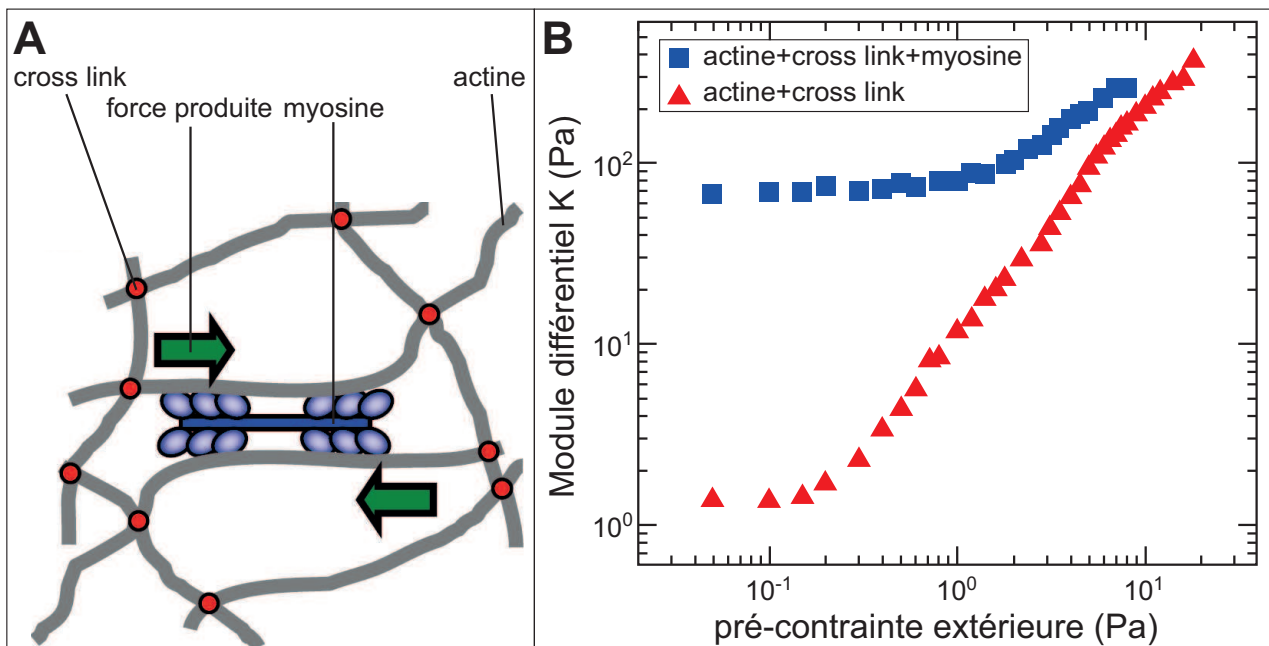


FIGURE 2.19 – A : Schéma de l'action de la myosine II sur un réseau réticulé d'actine ; B : Comparaison de l'effet de la pré-contrainte sur un réseau d'actine réticulé avec et sans Myosine+ATP ; D'après Koenderink et al. (2009)

Il pourrait s'agir d'un des mécanismes qui permet à la cellule de modifier dynamiquement son élasticité sans varier ni la composition ni la concentration de son cortex. Une augmentation de la concentration en ATP rend les moteurs plus actifs, ce qui génère plus de contraintes internes dans le cortex : celui-ci ayant des propriétés de non linéaire fortes, la cellule se rigidifie.

2.3.2 Réseaux assemblés à partir d'une surface

L'identification à la fin des années 90 du système protéique minimum permettant la reconstitution *in vitro* du gel d'actine présent dans le lamellipode a permis le développement de nouveaux systèmes expérimentaux. Le milieu de motilité reconstitué inclut cinq protéines et permet de polymériser un gel non plus en solution mais à partir d'une surface (plus de détails seront donnés sur ce système dans la section 3.1.2). Il ne s'agit pas ici d'étudier l'action d'une ABP sur la mécanique d'un réseau d'actine mais d'étudier la mécanique d'un gel d'actine construit par l'action synergique de plusieurs protéines. Ces gels sont denses et organisés contrairement aux gels d'actine polymérisés en solution. Cette organisation est principalement due à la présence de la protéine Arp2/3 qui nucléée des nouveaux filaments et forme des branches à 70° dans tout le réseau, aboutissant à une architecture dendritique.

Deux montages expérimentaux ont permis de s'intéresser à la mécanique de ces gels : dans chacun, on impose une force à un gel d'actine dense et branché en cours de polymérisation depuis une surface de quelques dizaines de micromètres carrés. Parekh et al. (2005) polymérisent le gel sur le levier d'un AFM (fig 2.20.C et D) dont ils contrôlent la flexion et la position par rapport au substrat. Marcy et al. (2004) forment une comète d'actine derrière une particule colloïdale collée à une pointe flexible de rigidité connue. Ils déforment ensuite la comète en imposant une force avec un système d'aspiration par micropipette (fig 2.20.A et B). Parekh et al. (2005) ont utilisé un extrait de milieu cellulaire pour polymériser leur gel et Marcy et al. (2004) un milieu de motilité reconstitué.

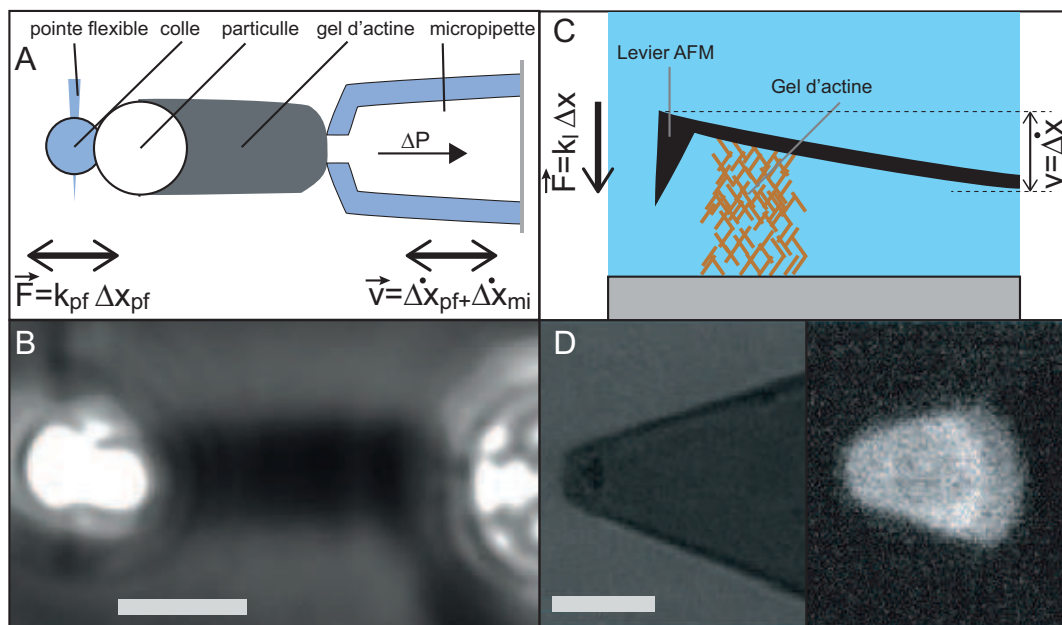


FIGURE 2.20 – A : Schéma de l'expérience de Marcy et al. (2004). Le déplacement imposé à la pipette génère une force F sur le gel d'actine détecté grâce à la déflexion d'une pointe flexible de rigidité connue ; B : Image en fond clair. Barre : $5 \mu\text{m}$; C : Schéma de l'expérience de Parekh et al. (2005). La vitesse de croissance et la force générée par la croissance du réseau d'actine sont mesurées à l'aide d'un levier AFM ; D : Image en fond clair. Barre : $10 \mu\text{m}$.

In vivo les réseaux formés par le complexe Arp2/3 étant impliqués dans la génération de force (déplacement du lamellipode (Friedl and Wolf, 2003) et propulsion de vésicules (Merrifield et al., 1999) ou de bactéries (Cameron et al., 2000) dans le cytoplasme), ces équipes ont étudié la relation entre la force appliquée au gel et sa vitesse de croissance. Ces expériences permettent de tester la relation force-vitesse prédite par les modèles de génération de force d'un gel d'actine dendritique au contact d'une paroi comme le brownian ratchet model (Mogilner and Oster, 2003) ou la nucléation autocatalytique (Carlsson, 2003).

Le montage sur AFM a également permis de s'intéresser aux propriétés mécaniques des gels d'actine polymérisés par la machinerie Arp2/3. En effet le montage sur micropipette étant principalement conçu pour étudier la relation force-vitesse Marcy et al. (2004) n'ont mesuré que le module élastique des gels. Chaudhuri et al. (2007) ont mesuré le module en appliquant une brève oscillation en force grâce au levier de l'AFM et en mesurant la déformation en phase. Ils calculent ensuite le module élastique comme la partie réelle du rapport de la contrainte sur la déformation et le module de perte comme sa partie imaginaire. En connaissant la distance entre le levier et le substrat grâce à un second levier d'AFM, ils contrôlent la pré-contrainte.

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

- Le module E de Young mesuré à faible pré-contrainte est de 985 ± 655 Pa, il varie faiblement en fréquence ($E \sim f^{0.13}$) (fig 2.21.A). Cette valeur est en accord avec celle estimée par Marcy et al. (2004) de 3.7 kPa. On peut noter que sans protéines de réticulation (autres que Arp2/3) les gels polymérisés par ce système sont mille fois plus rigides que les gels enchevêtrés et dix à cent fois plus rigides que les gels réticulés. Il est tout à fait remarquable que sans pré-contrainte, la valeur du module de Young de ces gels soit du même ordre que la rigidité de certains types cellulaires.
- Le module de perte E'' est bien inférieur au module élastique sur la gamme des basses fréquences (fig 2.21.A).
- Un comportement non linéaire unique a été observé : après un court régime linéaire, le module augmente (d'un facteur trois et demi sur la courbe reproduite en figure 2.21.B) quand la précontrainte augmente d'un facteur 10, puis suit une phase de décroissance : on assiste un assouplissement (fig 2.21.B). Le plus surprenant est que lors de la décharge, l'hystérésis est très faible ce qui écarte tout dommage fait au matériau (rupture de filament, glissement du gel) par la pré-contrainte.

La rigidification sous contrainte est observée pour des réseaux réticulés d'actine polymérisée en solution (voir partie précédente) même si ici, l'amplitude de cet effet non linéaire est plus faible. La phase d'amollissement réversible n'avait par contre jamais été rapportée. Les auteurs l'attribuent au flambage microscopique des filaments. Le flambage est une instabilité mécanique de structure initialement étudiée par Euler. Elle concerne une poutre soumise à un effort normal de compression qui, une fois une contrainte critique atteinte, fléchit subitement en se déformant dans une direction perpendiculaire à l'axe

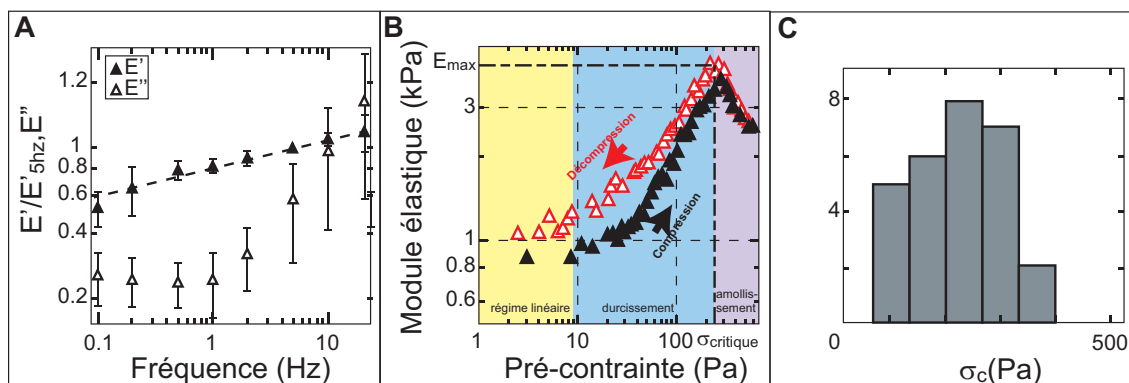


FIGURE 2.21 – A : Variation du module de Young et du module de perte en fonction de la fréquence de sondage. B : Exemple de variation du module de Young mesuré à 5Hz en fonction de la pré-contrainte. C : Histogramme des valeurs de contraintes au début de la phase d'amollissement

de compression, perdant ainsi toute rigidité longitudinale. L'idée est qu'après une phase de déformation affine, les filaments supportant la plus grande compression flambent : le nombre de filaments qui s'opposent à la déformation du matériau étant plus petit, le module de Young décroît. Le flambage étant réversible, les filaments vont de nouveau présenter une rigidité finie après la décompression d'où la faible hystérésis (fig 2.22). On peut également interpréter cette transition comme le passage d'une élasticité d'élongation (entropique ou enthalpique) à une élasticité de flexion enthalpique lorsque la contrainte augmente.

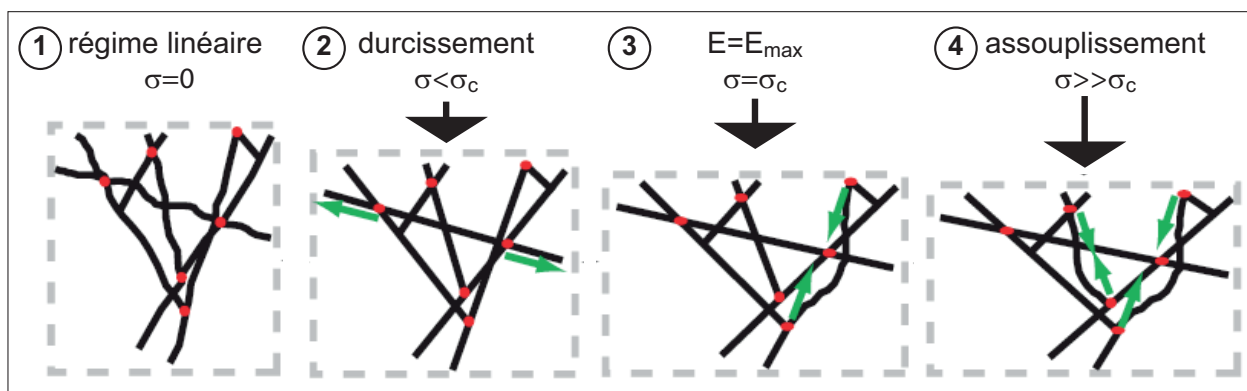


FIGURE 2.22 – Schéma du comportement non linéaire des gels d'actine denses : le matériau se déforme de manière affine à faible contrainte(1), le durcissement a comme origine une restriction des fluctuations thermiques des filaments (2), après une certaine contrainte les filaments soumis à la plus grande compression flambent et présentent une rigidité nulle (3 et 4), d'après Chaudhuri et al. (2007).

Dans ce chapitre, nous avons présenté les longueurs caractéristiques microscopiques des polymères et mis en évidence le rôle central joué par le rapport des longueurs L_c/L_p dans la pertinence des modèles théoriques. Les principaux résultats concernant les filaments semi-flexibles sont résumés dans le tableau 2.1. Nous avons vu que pour les réseaux ayant $L_c/L_p \sim 1$, les modèles proposés fonctionnent bien : le modèle du tube pour les gels enchevêtrés et le modèle d'élongation entropique pour les gels réticulés. Pour finir, nous

avons vu que des modèles avaient été proposés pour les gels denses et branchés, mais que peu d'expériences avaient été menées à leur sujet. C'est dans ce contexte que se place notre étude, dont nous allons détailler les aspects expérimentaux.

Chapitre 3

Aspects expérimentaux

3.1 Principe général de l'expérience

Notre dispositif expérimental permet de mesurer les propriétés mécaniques de gels d'actine reconstitués *in vitro* dont l'architecture dendritique est similaire à celle des gels présents dans le lamellipode des cellules. La croissance du gel *in vitro* est rendue possible grâce à un jeu de cinq protéines : Arp2/3, gelsoline, cofiline, VCA et actine. Nous stabilisons ensuite ce gel par l'ajout de la drogue phalloïdine. Ce système permet l'étude de gels beaucoup plus denses que ceux polymérisés en solution car ici la polymérisation s'effectue au contact d'une surface ayant au préalable été couverte du fragment de protéine activateur d'Arp2/3, VCA.

Dans notre dispositif expérimental, la surface utilisée est celle de particules colloïdales dites superparamagnétiques, qui acquiert un moment magnétique dipolaire important en présence d'un champ magnétique. Ainsi, lorsque deux particules se trouvent suffisamment proches l'une de l'autre, le couplage dipolaire entraîne l'apparition d'une force attractive qui mène à l'organisation des billes en chaînes alignées avec le champ. (fig 3.1)

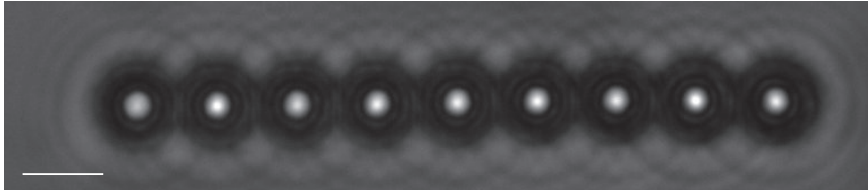


FIGURE 3.1 – Chaîne de colloïde magnétique, échelle 4 μm

Connaissant le champ magnétique et la distance entre le centre des billes, il est possible de calculer la force attractive entre chaque paire de particules dans la chaîne. Lorsqu'un gel d'actine se trouve entre deux billes, la force magnétique attractive est compensée par la force élastique issue de la déformation du gel $F_{mag} = -F_{el}$. La force élastique est liée à la contrainte mécanique σ dans le matériau tel que $\sigma = F_{el}/S_{contact} = E\epsilon$ ou E est le module de Young du matériau, $S_{contact}$ la surface de contact entre le gel d'actine et la particule colloïdale qui lui fait face et ϵ la déformation du gel. On remonte aux propriétés mécaniques du gel grâce à :

$$E_{actine} = \frac{-F_{mag}}{S_{contact}} \epsilon^{-1}$$

Comme le contact se fait entre deux sphères, $S_{contact}$ varie pendant la déformation, nous utilisons le modèle de Hertz pour déterminer E (section 3.6). Pour diminuer le bruit de mesure, nous effectuons une rampe de compression-décompression des gels en imposant une rampe de champ magnétique suffisamment lente pour que l'équilibre $F_{magn} + F_{meca} = 0$ soit respecté à chaque instant de la rampe. Chaque paire de particules séparées par un gel d'actine étant analysée indépendamment les unes des autres, on obtient un grand nombre de mesures d'élasticité.

Nous allons maintenant nous intéresser aux différents aspects de notre montage expérimental. Nous commencerons par décrire le milieu reconstitué permettant de polymériser un gel d'actine branché *in vitro* avant de nous tourner vers la description de notre "machine de force". Nous aborderons ses différents aspects : les colloïdes superparamagnétiques, la génération du champ magnétique et le traitement d'image. Nous terminerons par une description du modèle de Hertz corrigé que nous avons utilisé pour extraire le module de Young et l'épaisseur des gels à partir des courbes force-déplacement.

3.2 Assemblage *in vitro* d'un réseau branché d'actine

Intéressons-nous de plus près au système biochimique permettant la reconstitution *in vitro* d'un gel d'actine dendritique. Ce système, appelé machinerie Arp2/3, nécessite un ensemble de cinq protéines. Nous allons maintenant nous intéresser au cheminement qui a permis sa découverte dans les années 90, avant de décrire les protéines présentes dans notre milieu reconstitué.

3.2.1 Historique

Comète d'actine chez la bactérie

La compréhension des mécanismes permettant la formation du gel d'actine dans le lamellipode a été rendue possible grâce à l'étude du déplacement de la bactérie *Listeria monocytogenes*. En effet, après s'être introduite dans l'organisme par voie intestinale (Schlech et al., 1983) cette bactérie est internalisée par les cellules grâce à l'expression d'un jeu de protéines dont notamment l'internaline (Mengaud et al., 1996; Lecuit et al., 1997). Une fois dans le cytoplasme, elle forme une comète faite d'actine qui lui permet de se propulser et de passer de cellule en cellule en échappant ainsi au système immunitaire qui, lui, se trouve dans le milieu extracellulaire.

L'idée que le gel du lamellipode et celui constituant la comète formée par cette bactérie ont la même nature a fait son apparition à la fin des années 80 ; d'une part les images en microscopie électronique montraient des gels denses composés de filaments d'actine non parallèles les uns aux autres (fig 3.2), et d'autre part dans ces deux systèmes, il y a génération d'une force sans intervention de myosine (Tilney and Portnoy, 1989).

Le choix d'utiliser la comète plutôt que le lamellipode comme système modèle pour la recherche des acteurs protéiques impliqués repose sur une raison simple. Le gel d'actine se trouve à l'extérieur de la bactérie alors qu'il se trouve à l'intérieur de la cellule en migration, ce qui rend les modifications biochimiques et l'imagerie plus complexes voire impossibles (Cameron et al., 2000).

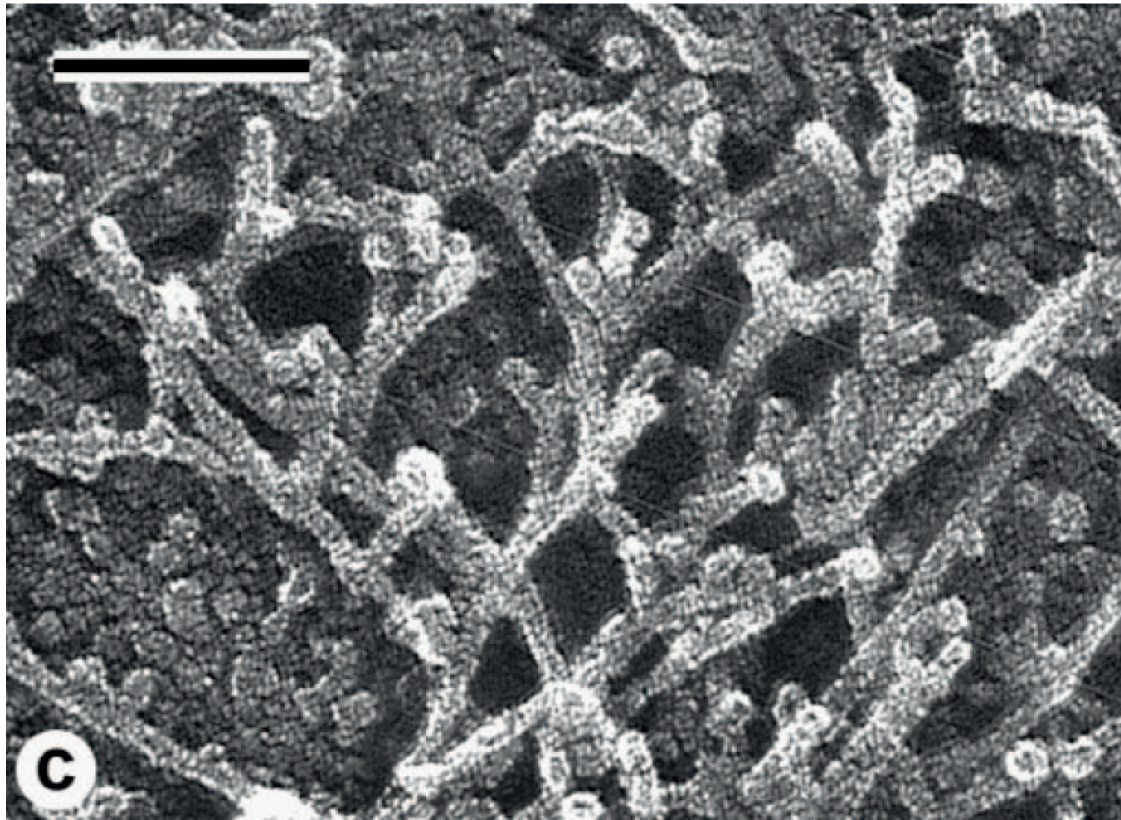


FIGURE 3.2 – Image en microscopie électronique de filaments d’actine d’un lamellipode, échelle : 100 nm.

La première étape a consisté à comprendre comment la bactérie arrivait à détourner l’actine cellulaire pour former une comète. Autrement dit, quelle protéine lui permet de localiser la polymérisation des filaments d’actine à sa surface et ainsi de se déplacer ? Cameron et al. (1999) ont identifié la protéine membranaire ActA, connue pour être un activateur d’Arp2/3 (Welch et al., 1998), comme nécessaire et suffisante pour induire la formation d’une comète. Pour ce faire, ils ont greffé ActA sur des particules colloïdales avant de les mélanger à un extrait cellulaire d’œuf de *Xenopus laevis*. Après quelques minutes, ils ont pu constater la formation d’un gel autour des billes puis, dans certaines conditions, la brisure de symétrie de ce gel et la mise en mouvement d’une bille propulsée par une comète d’actine (Cameron et al., 1999) .

Identification des protéines essentielles de la machinerie Arp2/3

L’étape suivante a concerné l’identification du jeu minimum de protéines nécessaires à la bactérie pour former une comète dans un milieu reconstitué. En effet, bien que le mélange de *Listeria*, d’actine-F et d’Arp2/3 entraîne la polymérisation d’actine à la surface des bactéries, il n’aboutit pas à la formation de comètes (Welch, 1997). Loisel et al. (1999) ont montré qu’en plus d’Arp2/3, d’actine-F et d’un activateur, il est nécessaire d’ajouter de la cofiline et une protéine de coiffe pour augmenter la concentration de monomères disponibles pour polymériser les gels (Loisel et al., 1999). En effet la cofiline et la protéine de coiffe modifient les concentrations critiques, ce qui déplace l’équilibre $[\text{actine-G}] \rightleftharpoons [\text{actine-F}]$ permettant ainsi d’augmenter d’un facteur 100 la concentration d’actine-G en solution.

On peut voir sur la figure 3.3 que cette augmentation est due à une action synergique de ces deux protéines : d'une part la cofiline se lie aux filaments présents en solution et accélère leur dépolymérisation, d'où une augmentation du taux de dissociation des monomères d'actine et de la concentration critique du bout pointu (C_c^p). D'autre part la protéine de coiffe se lie au bout barbé des filaments en solution et empêche la polymérisation de cette extrémité, d'où une diminution du taux d'association des sous unités au bout barbé en fonction de la concentration (Carlier and Pantaloni, 1997). La concentration d'équilibre (steady state) est la concentration à laquelle la vitesse de polymérisation du bout barbé est égale à la vitesse de dépolymérisation du bout pointu, ce qui est illustré par les flèches en pointillé dans la figure 3.3.

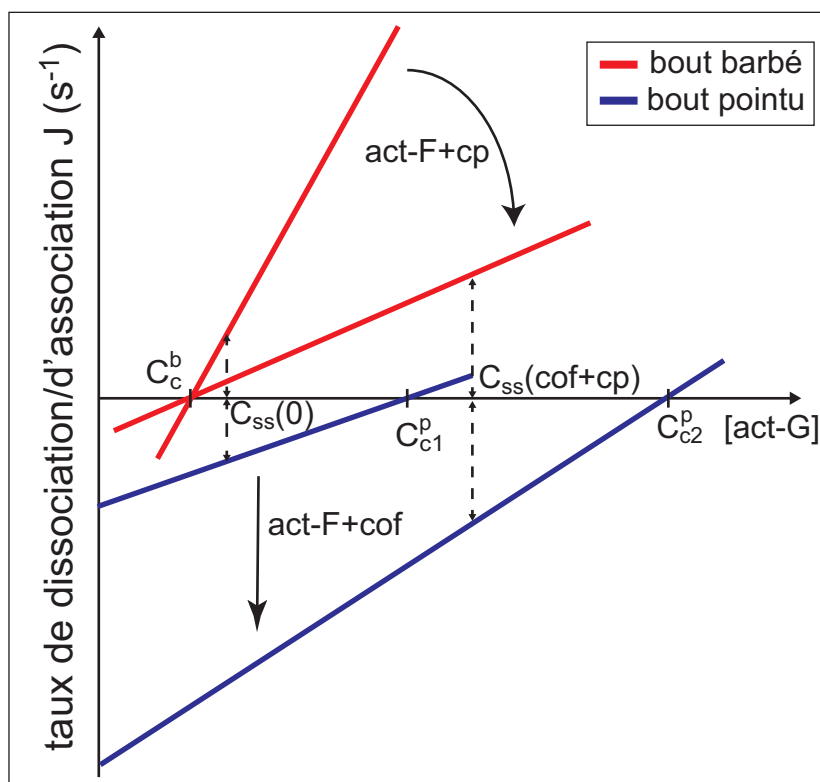


FIGURE 3.3 – Action de la cofiline et de la protéine de coiffe sur [actine-G] d'après Carlier and Pantaloni (1997). A l'équilibre la concentration en actine monomérique dans la solution est celle pour laquelle les flèches en pointillés sont de longueur égale (car dans ce cas la vitesse de polymérisation du bout barbé est égale à la vitesse de dépolymérisation du bout pointu).

Etudes biophysiques des gels reconstitués

Ce système expérimental, dont on peut contrôler finement la composition, permet la formation de gel ayant une concentration en actine comparable aux valeurs trouvées dans le lamellipode, de l'ordre de la $[0.1-1]$ mM (Abraham et al., 1999) et a permis des études quantitatives sur les gels d'actine denses et branchés. Les premières études consistaient à reproduire un mouvement de comète avec des billes sur lesquelles était greffé un activateur tel ActA, placées dans un milieu de motilité reconstitué. Les problématiques portaient notamment sur le lien qui existe entre des paramètres physiques comme la den-

sité de greffage, le rayon des billes, la concentration en ABP, la présence de protéines de réticulation et la vitesse de déplacement des billes, les conditions de brisure de symétrie ou les mécanismes de génération de force (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Wiesner et al., 2003; Van der Gucht et al., 2005).

Bernheim-Groswasser et al. (2002) ont ainsi montré que la vitesse moyenne des billes couvertes d'activateurs d'Arp2/3 dans un milieu reconstitué était inversement proportionnelle au rayon des billes (Bernheim-Groswasser et al., 2002). Le temps qui sépare le début de la polymérisation de la brisure de symétrie est proportionnel à la taille des billes. Van der Gucht et al. (2005) ont réalisé une étude systématique de la vitesse des billes et du temps de polymérisation en fonction de la concentration des différentes protéines du milieu de motilité reconstitué. Ils ont mis en évidence un optimum de vitesse et de temps de brisure pour certaines concentrations d'Arp2/3 et de gelsoline.

Noireaux et al. (2000) se sont intéressés aux contraintes générées dans le gel d'actine lors de sa croissance. Nous détaillons brièvement ci-dessous leurs calculs, car ils nous serviront à estimer les contraintes internes dans nos expériences (section 4.3.1).

L'activateur d'Arp2/3 se trouvant à la surface de la bille, c'est là que le gel est créé avant d'être poussé vers l'extérieur par une nouvelle couche de gel en cours de polymérisation. Une couronne de rayon initial $r(0) = R_{bille}$ et de périmètre $d(0) = 2\pi R_b$. aura un périmètre $d(\Delta t) = 2\pi(R_b + d_R)$ après Δt .

La déformation de la couronne est alors :

$$\epsilon = \frac{(d(t) - d(0))}{d(0)} = \frac{d_R}{R_b}$$

Pour une couche située à une distance r de la bille, avec E le module de Young du gel, la contrainte tangentielle peut donc s'écrire :

$$\sigma_{tt}(r, t) = \frac{d_R}{R_b} E$$

En utilisant l'équation d'équilibre mécanique en coordonnées sphériques et sachant que la contrainte radiale est nulle pour la couche extérieure située à une distance r_e du centre de la bille, on peut calculer la contrainte radiale pour une couche située à une distance r de la bille :

$$\sigma_{rr}(r) = 2E \left[\frac{R_e^2}{r^2} \left(\frac{R_e}{R_b} - \frac{1}{2} \right) - \frac{1}{R_b} + \frac{1}{2} \right]$$

La couche extérieure est donc soumise à une contrainte tangentielle maximale et à une contrainte radiale nulle tandis que la couche au contact de la bille est soumise à une contrainte tangentielle nulle et à une contrainte radiale maximale, issue de la pression appliquée par les couches extérieures qui souhaitent revenir à leur extension initiale (fig 3.4).

Lorsque la contrainte tangentielle atteint une valeur critique appelée contrainte de rupture, une brisure dans le gel conduit à la perte de symétrie nécessaire à formation de la comète (Van der Gucht et al., 2005).

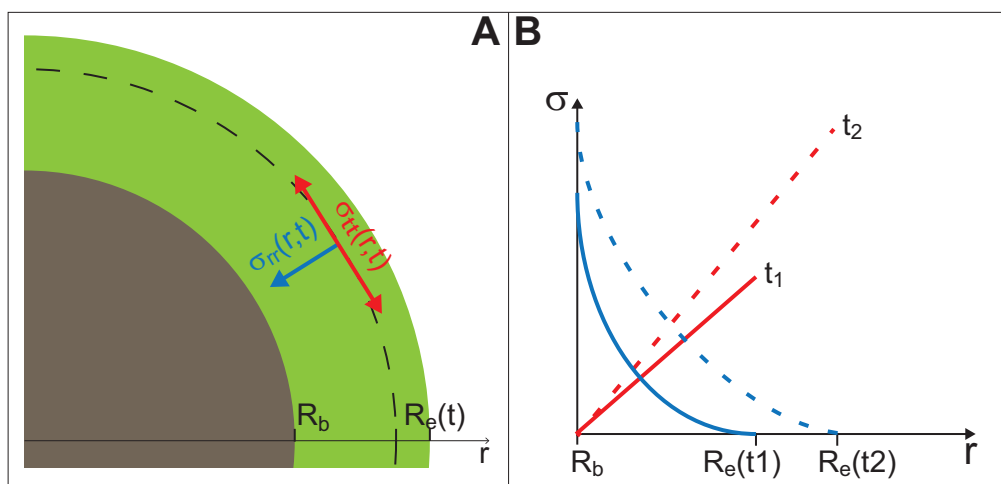


FIGURE 3.4 – A : Définition des notations ; B : Evolution des contraintes tangentielle et radiale en fonction de r à deux temps différents t_1 (bleu) $<t_2$ (rouge)

3.2.2 Modèle de la machinerie Arp2/3

Intéressons-nous maintenant plus spécifiquement aux cinq protéines utilisées dans notre milieu reconstitué : Arp2/3, gelsoline, coffline, VCA et actine.

Pour ce faire, étudions les étapes de croissance d'un filament appartenant à un réseau dendritique. Le modèle présenté est issu du " dendritic-nucleation/array-treadmilling model " (Pollard and Borisy, 2003) et les étapes se réfèrent à la figure 3.5.

La première étape est la formation du noyau de filament à proximité de la surface de croissance. Dans un système sans Arp2/3, le trimère initial est thermodynamiquement instable et c'est le passage de cette barrière de potentiel qui fait de la nucléation des filaments l'étape limitante lors de la formation d'un gel d'actine. Le système Arp2/3 et VCA contournent cette limitation en créant de novo des noyaux à proximité immédiate de la surface des particules colloïdales. C'est la restriction de la formation du gel à une surface 2D qui permet de polymériser un gel beaucoup plus concentré en actine que la solution mère.

La nucléation d'un filament fait suite à l'activation de Arp2/3 par VCA, un fragment de la protéine N-WASP. In vivo N-WASP est auto-inhibée à l'état neutre et change de conformation après son activation par PIP_2 et $Cdc42$, elle expose alors son extrémité C terminale qui comprend le fragment VCA (Higgs et al., 1999). Dans notre montage nous utilisons directement le fragment VCA. VCA est l'abréviation de V pour Verprolin homology domain, A pour le domaine Acidic domain et C pour Cofilin homology sequence. Le domaine V se lie à un monomère d'actine, le domaine A à Arp2/3 et la partie centrale aide à la liaison entre eux. Arp2/3 ("Actine Related Proteine 2 and 3") est un complexe protéique de 220 kDa composé de sept sous-unités (Robinson et al., 2001), dont certaines présentent une forte similitude avec l'actine.

L'activation d'Arp2/3 par le domaine VCA entraîne la fixation d'Arp2/3 sur un filament pré-existant et la nucléation d'une nouvelle branche où les monomères d'actine vont venir se fixer (étape 2)(Pollard and Borisy, 2003).

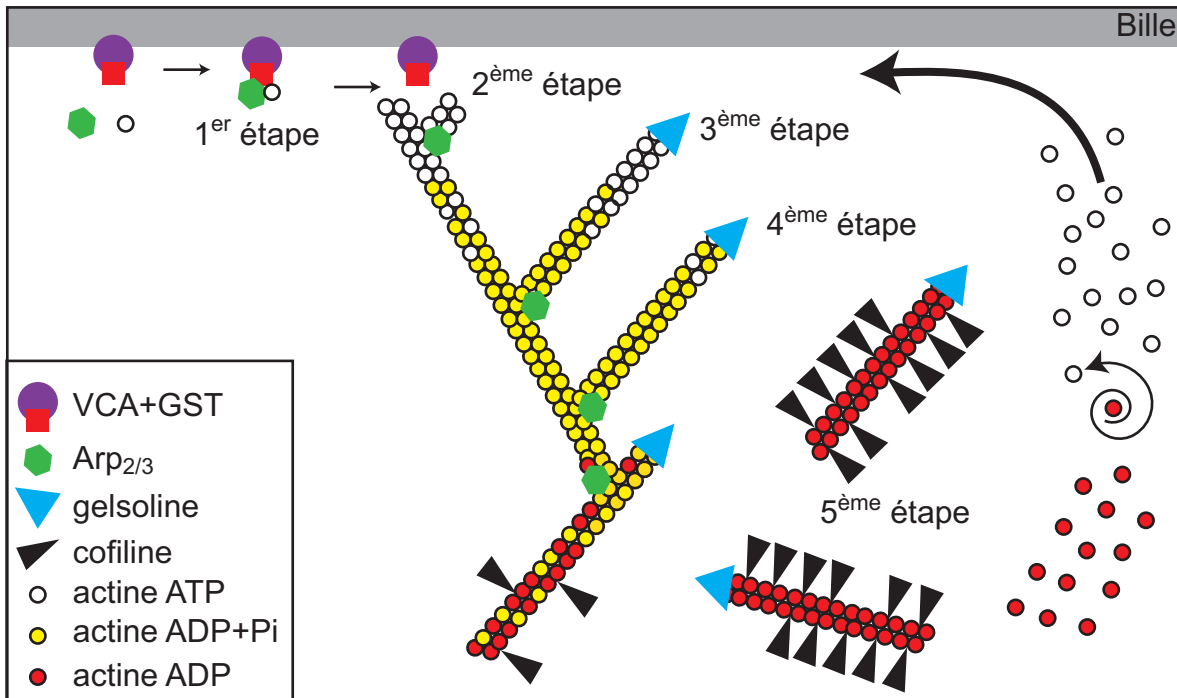


FIGURE 3.5 – Etape de croissance d'un filament dans un réseau dendritique d'après Pollard and Borisy (2003)

Une fois la nouvelle branche formée, celle-ci s'allonge par addition de monomères au bout barbé jusqu'à ce que cette extrémité soit couverte par une gelsoline (étape 3). La gelsoline est une protéine de 82 kDa, elle est sensible à la concentration en calcium et a principalement été utilisée pour ses propriétés de coiffe mais également pour sa capacité à couper les filaments (severing).

En présence d'ions Ca^{2+} , la gelsoline se lie avec deux monomères d'actine libre et forme un complexe très stable (GA_2). C'est ce dernier qui bloque la polymérisation du filament lorsqu'il se fixe sur son extrémité barbée. L'affinité de gelsoline pour A_2 est si forte que si le complexe n'est pas formé (temps trop court ou $[ActG]$ trop faible) la gelsoline se fixe directement sur le côté d'un filament préexistant, le rompt et couvre l'extrémité barbée nouvellement créée, d'où l'utilisation de cette protéine pour contrôler la longueur des filaments dans les expériences de rhéologie (Hinner et al., 1998). La grande stabilité du complexe GA_2 a également récemment permis d'utiliser la gelsoline comme nucléateur de filaments croissant par le bout pointu (Brangbour et al., 2011). (Burtnick et al., 1997; Sun et al., 1999)

Une fois coiffé, le filament s'éloigne de la surface, repoussé par la croissance des nouveaux filaments (étape 4).

La stabilité des branches dans un gel d'actine branché est une question ouverte. Les expériences de microscopie sur des filaments individuels ont montré une durée de demi-vie variant entre 500s (Blanchoin et al., 2000) soit comparable aux temps de croissance de nos gels, et plus d'une heure (Gandhi et al., 2010). Il est possible que la limitation des fluctuations des filaments dans un gel augmente la durée de vie des branches. En tout

état de cause, une fois les filaments stabilisés par la phalloïdine, le branchement est stable pour plusieurs heures (Blanchoin et al., 2000). Nous reparlerons dans les perspectives de la possibilité d'ajouter une ABP induisant spécifiquement le débranchement (Gandhi et al., 2010) après la croissance de nos gels.

Bien qu'elle n'intervienne pas directement dans la formation du réseau, revenons sur l'interaction entre la cofiline et un filament d'actine (étape 5). L'ADF-cofiline, ADF pour "Actine Depolymerisation Factor" se fixe sur un filament préexistant et modifie localement la rotation des deux protofilaments l'un autour de l'autre, rendant ainsi l'assemblage beaucoup plus souple (McCullough et al., 2008). Suarez et al. (2011) ont observé des filaments individuels et de la cofiline fluorescente en TIRF. Ils ont remarqué que les points de rupture se trouvaient dans les zones étroites non décorées par la cofiline comprises entre deux zones largement décorées. Leur interprétation est que les portions de filaments décorées étant plus souples, ils sont plus sensibles à l'agitation thermique ; la partie intermédiaire est, elle, plus rigide et concentre les contraintes jusqu'à la rupture.

Protocole expérimental

Après nous être intéressés à la vie et à la mort d'un filament dans un réseau dendritique, nous allons maintenant présenter les différentes étapes permettant la polymérisation et la stabilisation du gel autour des particules colloïdales dans notre dispositif expérimental.

Greffage de l'activateur

La première étape consiste à greffer l'activateur d'Arp2/3 à la surface des billes. Dans notre système ce greffage est réalisé par adhésion non spécifique. Les billes que nous utilisons ont des groupements époxy à leur surface, ce traitement de surface ayant été développé pour l'adhésion des protéines le greffage fonctionne bien. VCA risquant de perdre sa structure 3D et donc son activité une fois collé à une surface, nous utilisons VCA lié à GST (Glutathione S-Transferase). GST est un tag (une poignée en français) très courant en biologie. Dans notre système il n'est pas utilisé pour sa fonction mais comme une ancre pour greffer VCA sur la bille par adhésion non-spécifique. En effet au cours du greffage, GST étant plus gros que VCA, la probabilité que l'adhésion se déroule côté GST est plus importante.

Pour s'assurer que la surface des billes est bien saturée en VCA, la concentration en protéine est de 23 μM . En effet VCA a un rayon de l'ordre du nanomètre et la surface totale de particule colloïdale est de l'ordre de 50 mm^2 , une saturation des billes en VCA requiert donc 100 pmol. La concentration de 23 μM représente une quantité totale de VCA de 1 nmol soit dix fois la quantité requise. Après le greffage de VCA, les particules sont incubées pendant 15mn dans de la BSA (bovine serum albumine) à 1% pour passiver les surfaces non couvertes par VCA-GST. Après rincage, les billes sont conservées sur glace pendant 72h maximum.

Composition du mélange de croissance

Le mélange contenant toutes les protéines nécessaires à la polymérisation des gels est préparé en parallèle des particules. Pour des raisons de conservation, l'actine-G est stockée liée au cation Ca^{2+} . Pour la faire polymériser en solution, on échange le Ca^{2+} pour Mg^{2+} grâce à un chélatant du Ca^{2+} (de l'EGTA) et du MgCl_2 . A ce stade, la concentration en actine-G est donnée par la concentration d'équilibre de l'actine en l'absence d'autres

protéines, la majeure partie des monomères est donc sous forme filamenteuse. Par ailleurs, la proportion de monomères liés au fluorophore alexa 488 (fréquence d'excitation 499 nm, fréquence d'émission 519 nm) est fixée à 5%.

On ajoute ensuite l'actine polymérisée en solution au mélange de croissance tel que la concentration totale en actine (G+F) soit de 6.8 μM . Le milieu de croissance contient par ailleurs toutes les protéines nécessaires à la formation du gel sauf VCA : Arp2/3 ([10-400] nM), gelsoline ([20-250] nM) et cofiline (6.8 μM). Le milieu de croissance contient également de l'ATP (1.8 mM) qui sert de réserve d'énergie lors de la polymérisation. Arp2/3, gelsoline, cofiline et VCA ont été achetés à la société Cytoskeleton. L'actine nous a été fournie par le groupe de Marie-France Carlier du laboratoire d'enzymologie et de biochimie structurales de Gif sur Yvette. Les concentrations des différents tampons sont données en annexe B.

Croissance du gel

On laisse le mélange de croissance se stabiliser (10min) avant d'ajouter les billes greffées de VCA-GST. La croissance commence immédiatement après le mélange.

L'épaisseur des gels dépend, entre autres, du temps de croissance. Il s'agit d'un paramètre critique d'un point de vue mécanique puisqu'elle doit être suffisamment importante de manière à respecter certains critères de déformation maximale lors des mesures mécaniques (section 3.6.2). Cependant le temps de croissance ne doit pas être trop long, sous peine que les gels ne se brisent. La vitesse de croissance étant également fonction de la concentration en Arp2/3 et en gelsoline, les temps de croissance ont été ajustés de quatre à quinze minutes selon les compositions des milieux reconstitués (section 4.1.2).

A l'issue de ce délai, nous "fixons" les gels en diluant dix fois le milieu de croissance dans un tampon contenant 20 μM de phalloïdine. La dilution par dix suffit à stopper la polymérisation puisqu'elle divise la concentration de toutes les protéines du milieu, tandis que la dépolymérisation est empêchée par la phalloïdine. La phalloïdine est une drogue (provenant d'un champignon, l'amanite phalloïde) qui se fixe entre deux monomères d'actine avec une très forte affinité et qui rend leur séparation extrêmement difficile (Dancker et al., 1975). Une preuve de la grande stabilité des gels obtenus est que l'on peut aisément les observer 24 heures après leur croissance. Comme nous le verrons par la suite, la grande majorité de nos résultats ont été obtenus sur des gels fixés par la phalloïdine. Nous avons aussi étudié des gels non fixés pour mieux comprendre l'impact de cette molécule sur le réseau (section 4.2.1).

Une fois les gels stabilisés, nous concentrons les billes par centrifugation pour pouvoir ajuster le volume de l'échantillon à 8 μL . Nous ajoutons ensuite des billes uniquement couvertes de BSA (appelées billes nues ou billes BSA) avec un rapport de fraction volumique bille nue/ bille actine égal à un. Comme nous le verrons au chapitre 4, seul le contact entre une bille nue et une bille couverte d'actine est étudié car c'est le cas où nous sommes capables de calculer exactement l'aire de la surface de contact.

La chambre à échantillon est constituée d'une lame et d'une lamelle séparées par deux épaisseurs de parafilm collées à chaud. Pour limiter l'adhésion des billes sur la surface de la chambre, elle a préalablement été remplie de BSA10% pendant 45 min puis rincée deux

fois juste avant l'utilisation. L'échantillon est finalement introduit dans la chambre par capillarité puis scellé aux deux extrémités à l'aide de VaLaP (Vaseline, Lanoline, Paraffine en proportion 1 : 1 : 1) pour supprimer toute évaporation.

3.3 Colloïdes superparamagnétiques et mesure de force

3.3.1 Colloïdes superparamagnétiques

Fabrication

Les particules utilisées sont des Dynabeads M450 epoxy fabriquées par la compagnie Dynal. Bien qu'il existe plusieurs techniques pour fabriquer des particules magnétiques, nous ne nous intéresserons ici qu'à la synthèse des M450 (Ugelstad and Mork, 1980). La technique utilisée s'apparente à une synthèse Massart réalisée in situ.

Le protocole consiste à mélanger des particules de polystyrène de petite taille à des monomères de vinyle qui vont faire gonfler les particules par des effets entropiques. Le volume de polystyrène étant constant, on obtient des particules poreuses ayant une polydispersité très faible. L'étape suivante consiste à fonctionnaliser les pores en ajoutant des fonctions oxydantes au polystyrène. Ces fonctions permettent, une fois les particules en présence d'ions ferriques ferreux, de précipiter directement à l'intérieur des pores des nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 qui s'oxydent ensuite en maghémite $\gamma - Fe_2O_3$ beaucoup plus stable. Le ratio $Fe[II]/Fe[III]$ et le pH permettent de contrôler la taille des grains dont le diamètre moyen vaut typiquement 10 nm. Fonnun et al. (2005) ont mesuré la taille des nanoparticules par diffraction des rayons X et ont obtenu une valeur moyenne de 8 nm. (fig 3.6)

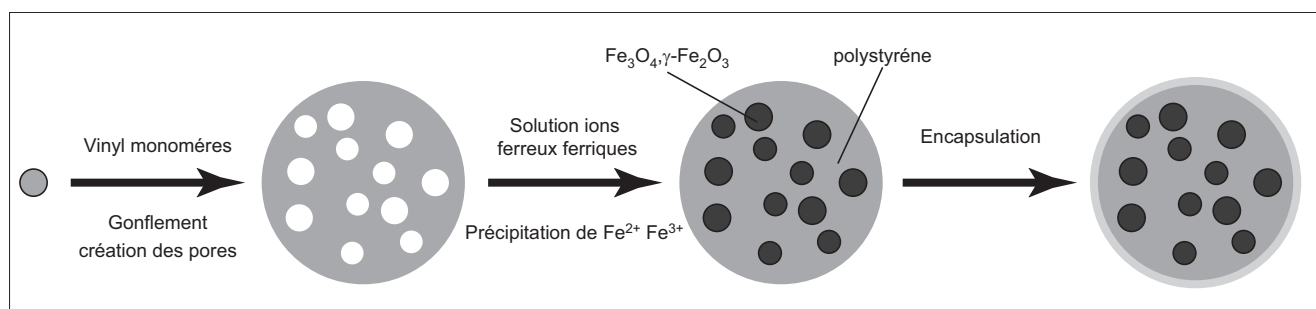


FIGURE 3.6 – Fabrication des billes

Superparamagnétisme

On définit la réponse d'un matériau à un champ magnétique B_0 (Tesla) par son aimantation \mathbf{M} ($A \cdot m^{-1}$) que l'on peut relier à l'excitation magnétique \mathbf{H} ($H = B_0/\mu_0$) grâce à la susceptibilité magnétique du matériau χ telle que $\mathbf{M} = \chi \cdot \mathbf{H}$.

On peut classer les matériaux selon trois grandes familles en fonction de leur réponse à un champ magnétique externe : diamagnétique, ferromagnétique ou paramagnétique. Chaque classe est caractérisée par une valeur typique de susceptibilité :

- Les matériaux diamagnétiques (argent, cuivre, eau, or, plomb, zinc) ont des valeurs de χ faibles et négatives : soumis à un champ, le matériau acquiert une aimantation faible de direction opposée à celle du champ.
- Les matériaux paramagnétiques (air, aluminium, magnésium, platine) ont eux aussi une susceptibilité magnétique basse (de l'ordre de 10^{-3}) mais positive. L'aimantation du matériau est faible et de la même orientation que le champ magnétique extérieur.
- Les matériaux ferromagnétiques (cobalt, fer, mu-métal, nickel) ont une susceptibilité de l'ordre de 10^5 pour des faibles valeurs de H, mais qui sature très rapidement. Contrairement aux matériaux dia et paramagnétiques, ils conservent une aimantation rémanente après la suppression du champ.

Le comportement des matériaux ferromagnétiques s'explique par le fait que le matériau est constitué de petits domaines, appelés domaines de Weiss. En l'absence de champ magnétique, la direction d'aimantation de chaque domaine est aléatoire : l'aimantation globale du matériau est nulle. L'application d'un champ magnétique extérieur aligne la direction des domaines et donne naissance à une aimantation macroscopique. Une fois le champ supprimé, les domaines conservent leur direction pendant une longue période de temps, donnant naissance à un champ magnétique rémanent (les aimants permanents sont faits de matériaux ferromagnétiques ayant été soumis à un fort champ). Le temps de relaxation de la direction d'aimantation d'un domaine est appelé temps de relaxation de Néel. Nous verrons par la suite que ce temps de relaxation varie exponentiellement avec le volume des domaines, ce qui explique pourquoi les matériaux massifs peuvent garder leur aimantation pendant des périodes allant jusqu'à des siècles (paléomagnétisme).

Le superparamagnétisme est un phénomène concernant les matériaux ferromagnétiques lorsqu'ils sont réduits à une taille nanométrique. Dans ces conditions, la particule n'est plus constituée que d'un unique domaine de Weiss et l'aimantation du grain est la somme de tous les moments magnétiques des atomes du grain. On parle d'approximation macro-spin. L'aimantation du domaine étant alignée avec le champ, le temps pour que l'aimantation retrouve une direction aléatoire après la suppression du champ extérieur est donné par le temps de relaxation de Néel relatif au passage d'une barrière de potentiel tel que :

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{kT}\right)$$

Avec τ_0 le temps d'attente du matériau (de l'ordre de $[10^{-9} - 10^{-10}]s$), K la densité d'énergie d'anisotropie (pour la maghémite, $K \sim 10^4 J \cdot m^{-3}$ (Birks, 1950), V le volume de la particule, k la constante de Boltzmann et T la température. Pour nos nanoparticules de 8 nm, on obtient un temps de relaxation de l'ordre de 2 ns. On néglige ici la relaxation de Brown relative à une rotation des nanoparticules car celle-ci est au moins un ordre de grandeur plus lente pour des particules de cette taille.

Comme nous l'avons vu, les particules colloïdales que nous utilisons sont remplies de ces nanoparticules de maghémite. En l'absence de champ, les particules nanoscopiques ont une direction d'aimantation aléatoire, l'aimantation globale de la bille est donc nulle ($M_{tot} = 0$). Par contre, une fois soumises à un champ externe, les particules nanoscopiques alignent leur aimantation avec le champ, donnant naissance à une magnétisation globale de la particule (fig 3.7). Une fois le champ supprimé, la magnétisation disparaît très rapidement.

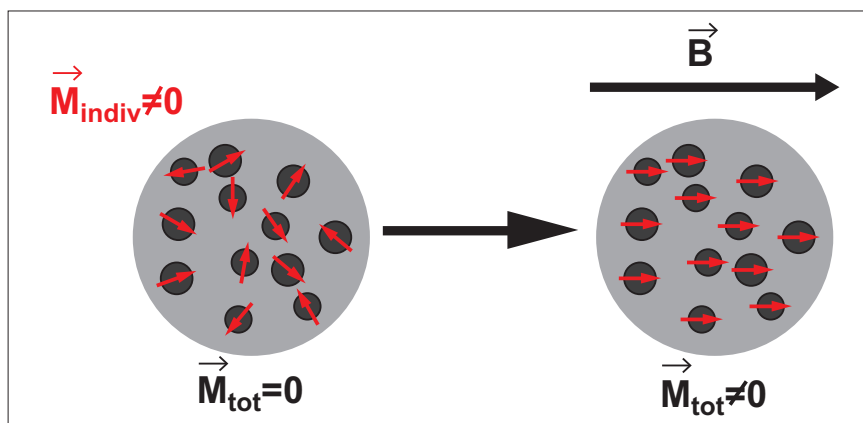


FIGURE 3.7 – Aimantation des billes superparamagnétiques

L'intérêt de matériaux superparamagnétiques est clair : ils combinent les avantages des matériaux ferromagnétiques (aimantation induite très importante) et des matériaux paramagnétiques (l'aimantation s'adapte instantanément au champ magnétique).

Caractéristiques des M450

Pour mesurer le diamètre et la polydispersité des particules, nous avons utilisé le chaînage de billes nues et mesuré la distance centre à centre (section 3.5.1). L'histogramme des distances centre à centre de 40 paires de billes est donné en figure 3.8.A ; nous obtenons $R = 4 \pm 0.02 \mu\text{m}$ soit une polydispersité de 0.5%. Cette valeur est plus faible que celle rapportée par Fonnum et al. (2005) (1.2%).

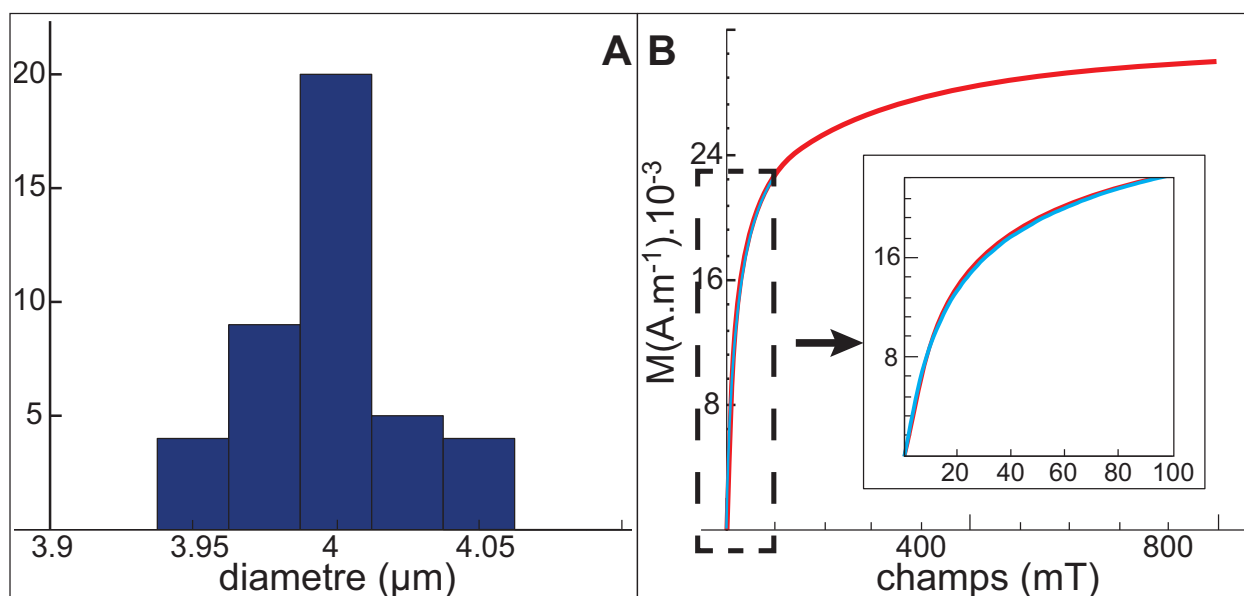


FIGURE 3.8 – A : Distance centre à centre de 40 paires de billes ; B : Fit de l'aimantation en fonction champ magnétique, d'après Fonnum et al. (2005).

Pour obtenir la susceptibilité des particules (dépendante de B_0) nous avons utilisé la mesure directe effectuée par Fonnum et al. (2005) sur les M450 en VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (fig 3.8.B). La courbe rouge est la mesure de Fonnum et al. (2005) et la courbe bleue représentant le fit que nous avons utilisé tel que :

$$M = \frac{(1.991 \cdot 10^{-3} \cdot B_0^3 + 17.54 \cdot B_0^2 + 153.4 \cdot B_0)}{(B_0^2 + 35.53 \cdot B_0 + 158.1)}$$

Nous n'avons pas effectué nous-même de mesure de magnétisation car cette technique consomme une très grande quantité de matière et la mesure de la réponse exacte d'un lot revient à le consommer entièrement. Pour prévenir une possible disparité dans les propriétés magnétiques des différents lots, nous avons utilisé le même lot de billes tout au long de mes travaux de thèse.

3.3.2 Interactions entre colloïdes

Des particules superparamagnétiques soumises à un champ magnétique homogène acquièrent une magnétisation importante et deviennent des dipôles magnétiques. Leur moment dipolaire est $\mathbf{m} = V_{part} \cdot \mathbf{M}$.

Deux particules isolées ont une interaction de type dipôle-dipôle. La force s'établissant entre elles s'écrit :

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

Avec μ_0 la permittivité du vide, d la distance centre à centre et θ l'angle entre la droite reliant les particules et le champ magnétique. La figure 3.9 représente l'évolution de la fonction $f(\theta) = (3 \cos^2(\theta) - 1)$. Le demi-espace autour d'une particule se divise en 2 : une zone où la force entre les particules est attractive (de $[0^\circ - 55^\circ]$ et une où elle est répulsive $[56^\circ - 90^\circ]$.

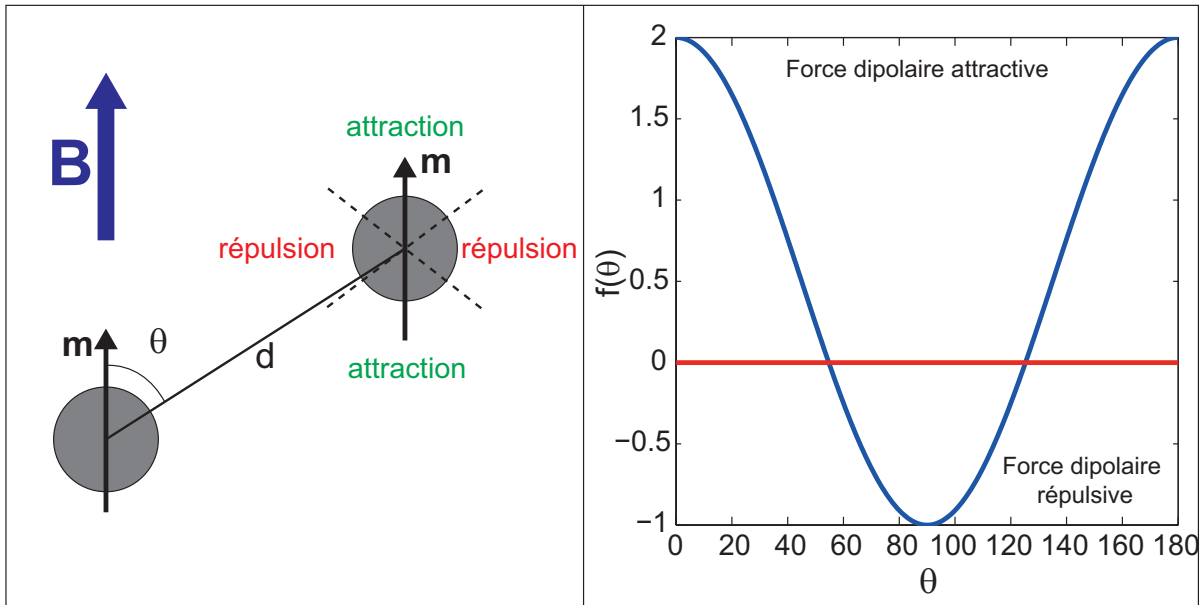


FIGURE 3.9 – Interaction entre deux billes

Les particules s'attirent l'une l'autre et s'alignent selon le sens du champ ($\theta = 0$). La force attractive entre les particules s'exprime alors par :

$$F_{attrac} = \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4}$$

avec μ_0 la permittivité du vide, m la norme du moment dipolaire et d la distance entre le centre des particules.

Lorsque plusieurs particules interagissent ensemble, elles s'attirent deux à deux jusqu'à former une chaîne de particules (leal Calderon et al., 2011). La force attractive dépendant de la distance entre les centres des particules à la puissance 4, il s'agit d'une interaction à très courte portée. Pour une liaison, la principale contribution vient des deux billes adjacentes. Zhang and Widorn (1995) ont décrit un modèle de chaîne infinie où toutes les billes sont séparées par une même distance d . Dans ces conditions :

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

$\xi(3)$ est une fonction de Riemann

Le modèle de la chaîne infinie n'est pas adapté à notre estimation de la force, car la distance entre les particules est variable, et nos liaisons sont parfois en bout de chaîne. Connaissant la distance exacte entre toutes les particules nous avons calculé la force attractive d'une liaison n en incluant l'interaction entre les billes adjacentes (n et $n+1$) ainsi que celle entre les seconds voisins ($n-1$ et $n+1$, n et $n+2$). Cette méthode permet de minimiser l'erreur tout en prenant en compte différentes situations.

La force magnétique maximale dans notre dispositif est de l'ordre de 1000 pN (pour un champ de 80 mT et une distance entre bords de billes de 0.5 μm). On peut comparer cette force à celle générée par un dispositif classique en biophysique : la pince magnétique. Dans cette technique, le champ appliqué n'est pas homogène et c'est le gradient de champ qui crée une force sur la particule telle que :

$$F_{mag} = \frac{\mathbf{m}}{2} \nabla \mathbf{B} \quad (3.1)$$

Pour un dispositif comme celui de Amblard et al. (1996) le gradient est de 10 T \cdot m⁻¹ pour un champ maximal de 100 mT. La force magnétique pour des billes comme les nôtres est alors de 1 pN, soit trois ordres de grandeur inférieurs à la force d'attraction dipolaire utilisée dans notre dispositif.

3.4 Montage expérimental

3.4.1 Description

Le montage expérimental est présenté en figure 3.10. L'échantillon est placé sur un microscope inversé Zeiss axio A1 équipé d'un objectif x100 à immersion ayant une ouverture numérique de 1.4. De part et d'autre de l'échantillon se trouvent deux bobines de dimensions : longueur 40 mm, diamètre intérieur 26 mm, diamètre extérieur de 88 mm et comprenant 750 spires chacune, en configuration pseudo-Helmholtz.

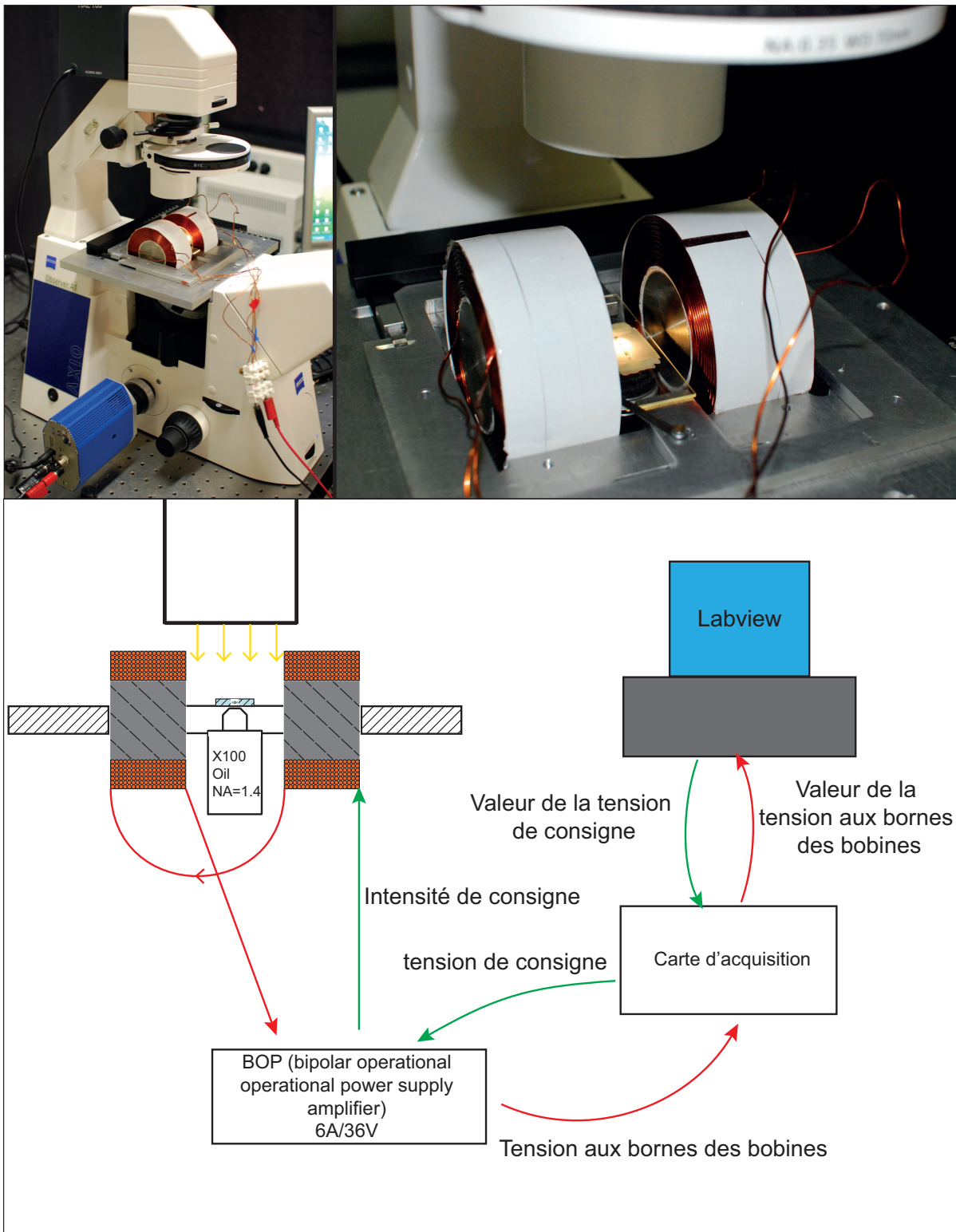


FIGURE 3.10 – en haut, photo du montage expérimental; en bas, schéma du montage expérimental

Les bobines sont en configuration directe, c'est-à-dire que le courant qui les parcourt est dans le même sens de manière à créer un champ homogène entre les deux bobines (si le courant qui les parcourt était en sens opposé, le champ serait nul entre les deux bobines et le gradient maximal (fig 3.11).

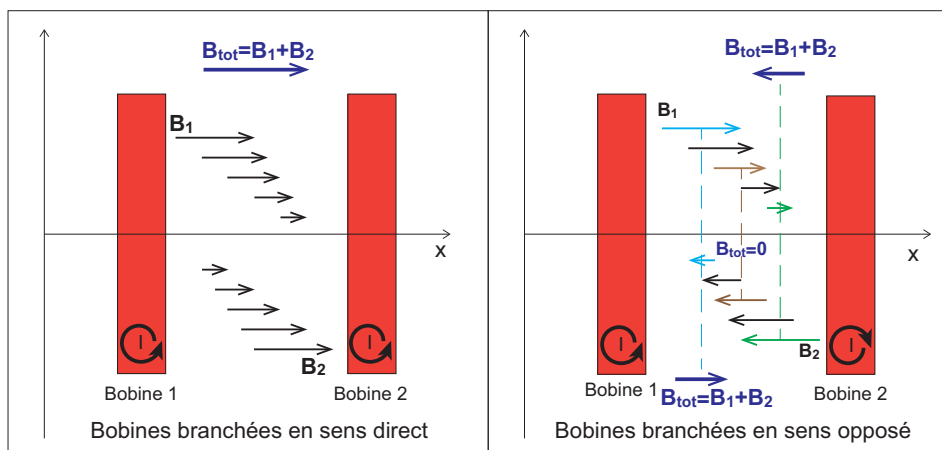


FIGURE 3.11 – montage des bobines opposé et direct

On parle de configuration pseudo-Helmholtz car dans une vraie configuration d'Helmholtz, l'écartement des bobines est égal à leur rayon de manière à ce que le champ entre les deux bobines soit parfaitement homogène. Dans notre cas, nous avons été obligés de les écarter un peu plus à cause de l'encombrement de l'objectif du microscope.

Un cœur de mu-métal a été placé à l'intérieur des bobines pour augmenter et concentrer les lignes de champ magnétique. Nous reviendrons sur l'allure du champ ainsi que sur une évaluation du gradient lié à la pseudo configuration d'Helmholtz par la suite.

Le champ magnétique est proportionnel au courant I parcourant les bobines. Elles sont alimentées par une source idéale de courant appelée BOP (Bipolar Operational Power supply amplifier) de 6A/36V. Dans le cas des BOP, on parle de source idéale de courant car celle-ci fournit vraiment une intensité proportionnelle à la tension de consigne. Il s'agit d'un point important car d'un point de vue électrique, les bobines sont des inductances, elles vont donc s'opposer à une modification rapide du courant les parcourant. L'utilisation d'une source de courant idéale permet un meilleur contrôle du champ et réduit le bruit de mesure (fig 3.12).

La BOP est elle-même contrôlée par une carte d'acquisition pilotée par Labview. La carte d'acquisition délivre une tension de consigne à la BOP et mesure en retour la tension aux bornes des bobines. Cette mesure de tension n'est utilisée que pour contrôler que tout se déroule normalement car comme montré dans la figure 3.12, la tension aux bornes des bobines est entachée d'un bruit qui n'affecte que la tension et pas l'intensité donc pas le champ magnétique. La mesure du champ magnétique se fait grâce à la valeur de la tension de consigne. Avant chaque série d'expérience, le facteur de proportionnalité entre la tension de consigne et le champ magnétique est étalonné grâce à un Tesla mètre. Au cours d'une rampe de force, la caméra émet un TTL à chaque image acquise, ce qui permet à Labview de noter le champ exact à cet instant, assurant ainsi une synchronisation parfaite.

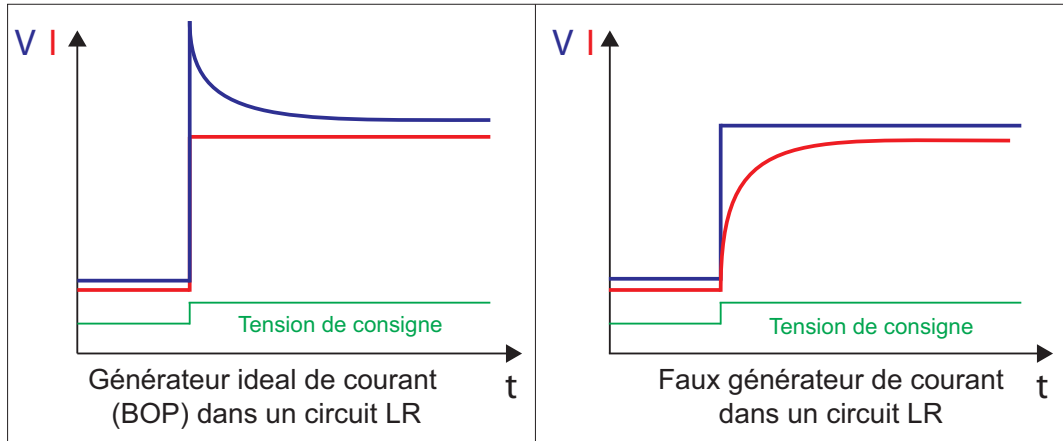


FIGURE 3.12 – comparaison Bop-générateur de courant

3.4.2 Champ magnétique

Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, le champ magnétique est généré à l'aide de bobines d'Helmholtz. Seul le champ généré par des bobines idéales le long de l'axe est aisément calculable et vaut :

$$B = \left(\frac{4}{5}\right)^{\frac{3}{2}} \frac{\mu_0 n I}{R}$$

Avec μ_0 la permittivité du vide, n le nombre de spires, I l'intensité parcourant les bobines et R le rayon d'une bobine. En prenant le rayon moyen des bobines égal à 57 mm, le nombre de spires égal à 750 et une intensité de 5A, on obtient un champ de l'ordre de 50 mT.

Bien que l'ordre de grandeur du résultat soit proche de la réalité expérimentale, les approximations de ce modèle sont très importantes (bobines infiniment fines, distance entre les bobines égale à leur rayon, pas de μ métal dans les bobines). De plus, l'évaluation du champ hors de l'axe des bobines et donc du gradient de champ se révèle mathématiquement complexe. Pour pallier ces difficultés lors de la conception du montage, nous avons utilisé le logiciel de calcul par éléments finis dédié au magnétisme FEMM (Finite Element Method Magnetics). Le champ calculé à 5A pour notre système est donné en figure 3.13.

On voit que le champ généré par les bobines avec la BOP à 80% de sa puissance est de l'ordre de 75 mT, ce qui est amplement suffisant pour nos mesures. La figure 3.13.B donne le gradient de champ dans l'axe des bobines et la figure 3.13.A perpendiculairement à celui-ci. On peut voir que dans les deux cas, le gradient de champ est de l'ordre de $3 \cdot 10^{-2} \text{mT} \cdot \text{mm}^{-1}$. En utilisant la formule 3.1, on obtient que ce gradient génère, à champ maximum, des forces de l'ordre de 10^{-3}pN . Ces forces étant cinq ordres de grandeur moins fortes que celles liées à l'interaction dipolaire, elles peuvent être négligées. Cela est confirmé expérimentalement par le fait que des particules très éloignées les unes des autres ne se déplacent pas, même à champ maximum.

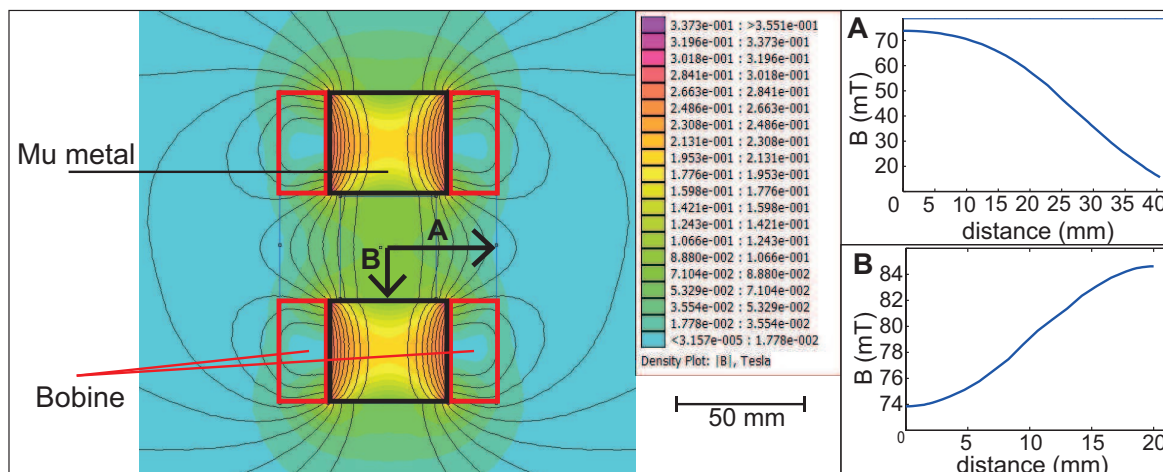


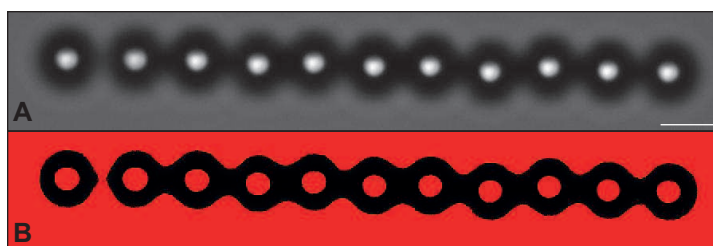
FIGURE 3.13 – Visualisation des lignes de champ par calcul d'éléments finis

3.5 Traitement d'image

3.5.1 Détermination de la distance entre colloïdes

Les images sont capturées par une caméra CCD Coolsnap ES2 de chez Roper Scientific codant les images sur 12 bits (4096 niveaux de gris). Bien que le capteur de la caméra mesure 1040x 1392 pixels, compte tenu de la géométrie unidimensionnelle des chaînes étudiées nous n'utilisons que sa partie centrale (Region Of Interest (ROI) = 200*1392) de manière à atteindre une fréquence d'acquisition plus importante (27 Hz) par rapport au temps total de l'acquisition (10 s). L'utilisation d'un objectif x100 à immersion permet d'obtenir un grossissement final tel que 1 pixel = 57 nm.

Intéressons-nous tout d'abord à la mesure des distances entre particules à partir d'une image dans le visible (fig 3.14.A). Le traitement des acquisitions était initialement réalisé avec ImageJ (NIH) mais le traitement acquisition par acquisition étant très chronophage, j'ai développé un algorithme automatisé sous Matlab. Dans les deux cas, la méthode est la même et les résultats pour une chaîne donnée sont identiques. Pour optimiser la détection du centre des billes, l'image est focalisée sur le haut des particules. Chaque bille donne alors un maximum d'intensité (donc dans les blancs) entouré d'un minimum d'intensité (donc dans les noirs). Pour discriminer les billes entre elles, on fixe un seuil de niveau de gris. Chaque tache ne touchant pas le bord de l'image sera identifiée comme une bille (fig 3.14.B).

FIGURE 3.14 – A : Image en champ clair ; B : Résultats du seuillage ; échelle 4 μm

Une fois les billes identifiées, l'étape suivante consiste à déterminer la position des centres. Pour ce faire on calcule la position moyenne d'une tache en pondérant la position de chaque pixel lui appartenant par son niveau de gris. Cette méthode permet d'atteindre une résolution inférieure à 20 nm. La figure 3.15 montre la position d'une bille collée à la surface de la lamelle : en bleu la détection par moyenne pondérée et en rouge le fit de la tache blanche par un cercle. On voit que les points bleus se basant sur plus d'informations sont nettement moins dispersés. Ce traitement effectué sur toutes les images d'une acquisition permet d'obtenir la distance entre chaque paires de billes en fonction du temps et donc en fonction du champ magnétique.

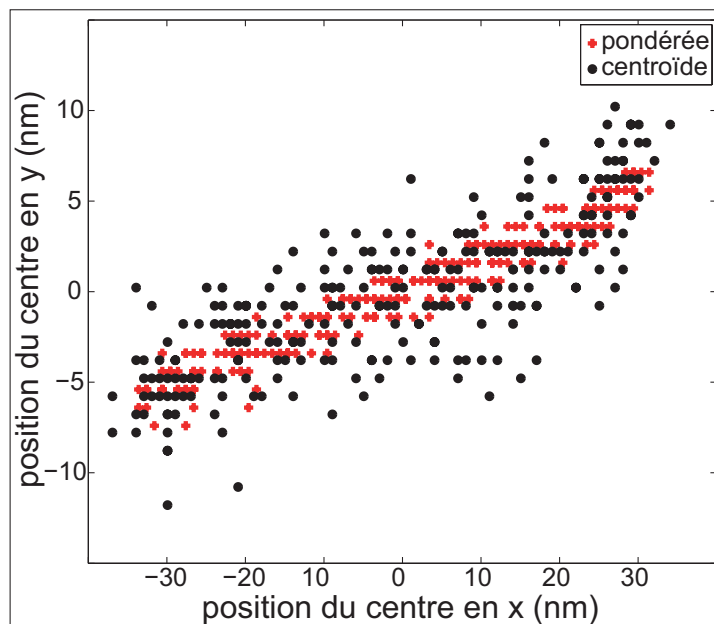


FIGURE 3.15 – Position d'une bille mesurée par la moyenne pondérée des niveaux de gris de la tache blanche et par le fit de la tache par un cercle (centroïde). La largeur du nuage en x est due à la dérive du système

3.5.2 Mesure de fluorescence

Dans les images en fond clair, les gels d'actine sont peu visibles, c'est la présence dans les gels de monomères d'actine liés à un fluorophore qui nous permet de les voir. On peut ainsi contrôler quelle bille est couverte d'actine mais aussi l'intégrité physique des gels. On peut également comparer l'intensité émise par chaque gel, grandeur qui est liée à la quantité d'actine dans le gel.

Acquisition des images de fluorescence

Après chaque acquisition, on ajuste le focus sur le plan équatorial des billes, puis on prend une image en fluorescence à l'aide d'une lampe X-cite XPS-120 émettant un flash pendant 100 ms dans un filtre n°17 de Zeiss (excitation : 485 nm, séparateur de faisceau : 510 nm, émission : 515-565 nm). Les monomères sont liés au fluorophore Alexa 488 (absorption : 495 nm, émission : 519 nm). Un exemple d'image est donné en figure 3.16.A. L'intégrité physique du gel (pas de brisure par exemple) est vérifiée à l'œil durant l'analyse. La mesure

de fluorescence moyenne du gel a, quant à elle, nécessité l'élaboration d'un traitement d'image avancé comprenant deux étapes, la détection du centre des particules fluorescentes et la mesure d'un profil moyen.

Détermination du centre des particules dans les images de fluorescence

Comme pour les images en fond clair, la première étape du traitement d'image consiste à discriminer les particules entre elles, c'est-à-dire à identifier la position du centre des billes fluorescentes. Cependant lorsque l'on éclaire en fluorescence, ce sont les gels eux mêmes qui sont la source de lumière et il n'y a pas de minimum d'intensité entre deux billes adjacentes couvertes d'actine. La méthode du seuillage sur les niveaux de gris ne permet donc pas de les séparer (fig 3.16.B). Une identification manuelle étant très chronophage (20 à 50 chaînes par échantillon contenant entre une et dix-huit billes fluorescentes) il a fallu avoir recours à un traitement d'image plus poussé pour identifier le centre des particules fluorescentes.

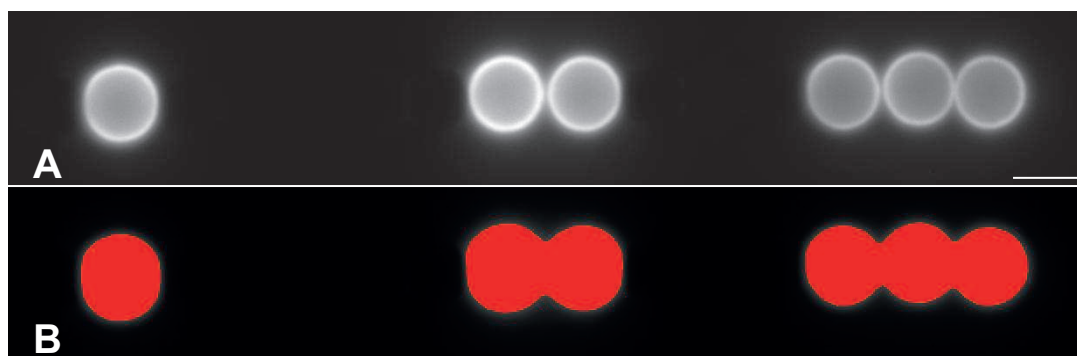


FIGURE 3.16 – A : Image de fluorescence ; B : Image de fluorescence après seuillage ; échelle 4 μm

Une image en niveau de gris est une matrice 2D, chaque coefficient indiquant le niveau de gris d'un pixel. Une représentation 3D de l'image de la figure 3.16.A est donnée en figure 3.17.A'. Pour identifier le centre des particules nous effectuons un produit de convolution entre l'image de fluorescence et une matrice couronne de diamètre de l'ordre de celui des gels avant de détecter les maximums locaux sur l'image de sortie.

Pour mieux comprendre, intéressons-nous à un pixel ij en particulier. On multiplie terme à terme l'image fluorescence par une matrice de même taille que l'image initiale mais ne contenant que des 0 sauf une couronne de 1 centrée sur le pixel ij et de diamètre de l'ordre de celui des gels (fig 3.17.B). On somme toutes les valeurs de la matrice résultat obtenant ainsi une valeur numérique que l'on attribue au pixel ij . On répète cette procédure pour tous les pixels de l'image en fluorescence (en déplaçant le centre de la couronne) ce qui nous donne une nouvelle image (fig 3.17.C). Il est clair que dans la nouvelle image, les valeurs maximales sont atteintes quand le pixel ij est au centre d'une bille fluorescente. Il ne reste plus qu'à détecter les maximums locaux sur l'image de sortie pour obtenir la position du centre des billes.

Cette méthode est robuste à deux conditions : que l'intensité lumineuse émise par les gels soit bien supérieure à celle émise par le fond (si le rapport $\frac{I_{gel}}{I_{fond}} < 4$ des erreurs se

produisent fréquemment) et que la fluorescence des billes ne soit pas trop différente les unes des autres. Avec de bons paramètres (temps de pause et proportion de monomères fluorescents), ces deux conditions sont généralement remplies, permettant un traitement rapide des images de fluorescence avec une seule intervention manuelle (renseigner le nombre de billes fluorescentes par image), et une vérification finale.

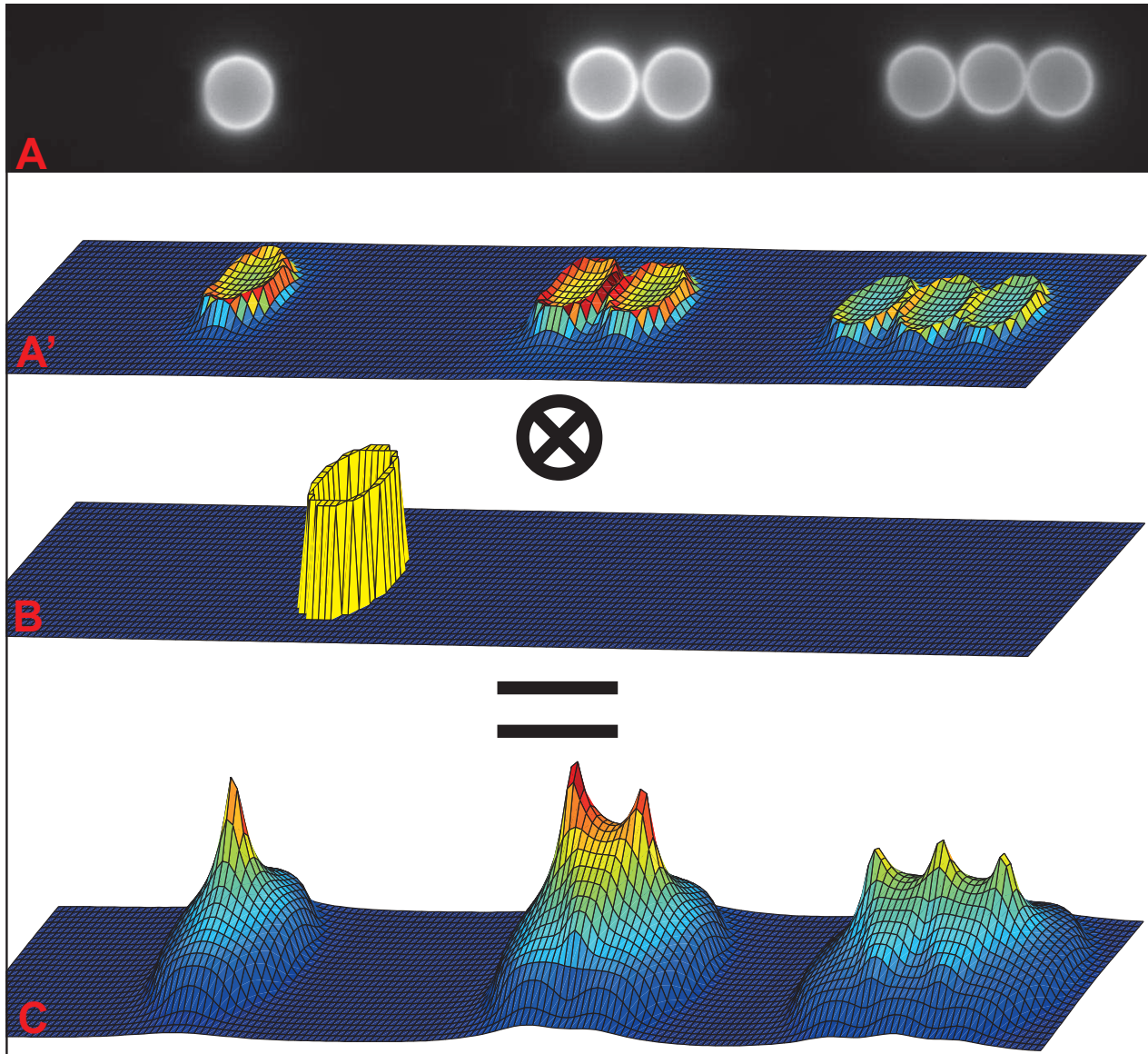


FIGURE 3.17 – Détection du centre des billes fluorescentes

Quantification de la fluorescence

Une fois le centre de chaque particule identifié, on mesure vingt profils par bille. Ces profils sont longs de $3.4 \mu\text{m}$ (distance plus longue que l'épaisseur des gels mais raisonnable pour ne pas sortir de la ROI) entre les angles $[-\frac{\pi}{2}; -\frac{\pi}{6}]$ et $[\frac{\pi}{6}; \frac{\pi}{2}]$ (fig 3.18.A) de manière à ne pas être perturbé par la bille adjacente. On moyenne ces vingt profils pour obtenir un profil moyen. A partir de ce profil moyen, on calcule la densité de fluo comme la valeur moyenne de ce profil sur l'épaisseur du gel i.e. entre r et $r+e$ (fig 3.18.B).

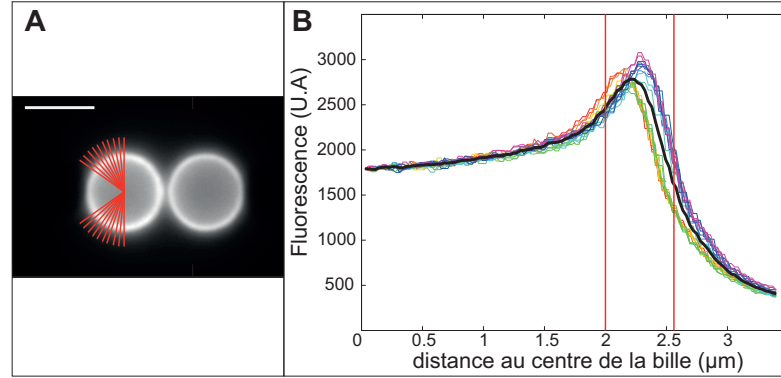


FIGURE 3.18 – A : Image de fluorescence avec les profils, échelle 4 μm ; B : Calcul du profil de fluorescence moyen, en rouge la limite de la bille et la limite du gel déterminée par l'analyse mécanique

3.6 Détermination du module élastique : modèle de Hertz

Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse des acquisitions consiste à mesurer la distance entre les particules et à l'associer à une valeur de champ magnétique pour calculer la force attractive entre les particules à chaque image. On reconstruit ainsi une courbe force-distance pour chaque paire de particules à partir de laquelle on réalise deux mesures : le module de Young (E) et de l'épaisseur du gel (e).

Le modèle de Hertz (Hertz, 1881) a été développé pour modéliser le contact entre deux sphères élastiques. La particularité de ce problème mécanique est que la surface de contact entre les deux solides évolue avec l'indentation, rendant l'accès aux grandeurs élastiques du matériau non trivial. La force F s'exprime :

$$F \sim \frac{4}{3} E \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \cdot R^{\frac{1}{2}}$$

Avec E le module de Young, δ l'indentation et R un rayon de courbure. L'allure de la force en fonction de l'indentation est donnée en figure 3.19.

Nos courbes force-déplacement sont ajustées par le modèle de Hertz avec deux paramètres ajustables : le module de Young E et l'épaisseur du gel e tel que la distance séparant le centre des deux billes d soit à tout moment égale à : $d = e + 2R_{bille} - \delta$.

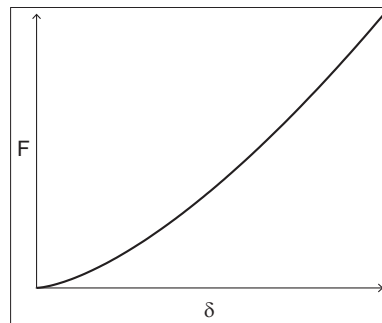


FIGURE 3.19 – Allure d'une courbe F en fonction de l'indentation pour le contact de Hertz

L'une des autres spécificités de la géométrie du contact sphère-sphère est que les contraintes à l'intérieur du matériau sondé sont hétérogènes. Dans le plan xy , les contraintes ont une répartition parabolique : la déformation est maximale au centre du contact et nulle sur les bords (fig 3.20). Dans le plan yz , la contrainte est maximale au niveau du point de contact et tend vers zéro quand on s'en éloigne en z (Johnson, 1987) (fig 3.20).

Bien qu'il existe une démonstration rigoureuse permettant le calcul du préfacteur, Pierre-Gilles de Gennes a fait un calcul en ordre de grandeur très élégant qui permet de relier la force appliquée F à l'indentation δ et au module E du plan. C'est ce calcul que nous présentons ici (les grandeurs sont définies dans la figure 3.20). Pour des raisons de clarté nous nous intéresserons seulement au contact entre une sphère infiniment rigide et un plan élastique. Notons cependant qu'il existe une équivalence entre l'indentation de deux sphères de rayon respectif R_1 et R_2 et de module d'Young E_1 et E_2 et l'indentation d'une sphère infiniment rigide de rayon $\frac{1}{R_{eq}} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}$ dans un matériau plan de module de Young $\frac{1}{E_{eq}} = \frac{1}{E_1} + \frac{1}{E_2}$.

3.6.1 Modèle de Hertz par analyse dimensionnelle

A condition que la déformation soit petite et que le matériau soit homogène et isotrope, on peut assimiler la surface de contact de la sphère avec le matériau déformé à un disque de rayon a . Toute la simplicité du calcul repose sur le fait que a est la seule distance caractéristique du problème.

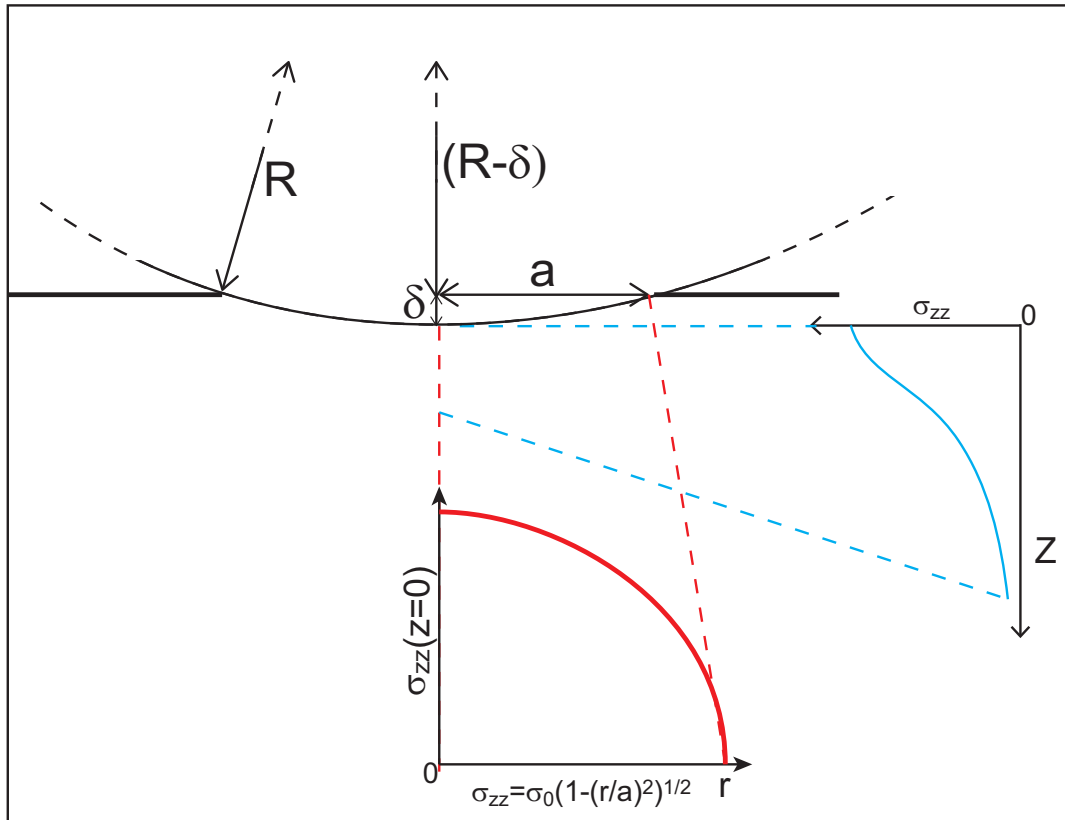


FIGURE 3.20 – Définition des grandeurs apparaissant dans le modèle de Hertz

On voit sur la figure 3.20 que d'après Pythagore on peut écrire :

$$\begin{aligned} R^2 &= a^2 + (R - \delta)^2 \\ R^2 &= a^2 + R^2 - 2R\delta + \delta^2 \\ \left(\frac{a}{R}\right)^2 &= 2\frac{\delta}{R} - \left(\frac{\delta}{R}\right)^2 \end{aligned}$$

R étant très supérieur à δ on peut négliger le terme d'ordre deux en $\frac{\delta}{R}$ et obtenir une relation entre a, R et δ telle que :

$$a = \sqrt{R\delta} \quad (3.2)$$

Au cours de la déformation le travail fourni pour se déplacer d'une distance δ est :

$$W_{indent} = F \cdot \delta$$

Puisqu'il s'agit d'un matériau élastique, la densité d'énergie de déformation est donnée par :

$$d_{def} = \sigma \cdot \epsilon$$

La loi de Hook ($\sigma = E \cdot \epsilon$) nous permet d'écrire :

$$d_{def} = E \cdot \epsilon^2$$

Grâce à l'analyse dimensionnelle on peut écrire la déformation comme étant égale à l'indentation δ divisée par la seule distance caractéristique du problème a :

$$d_{def} = E \cdot \left(\frac{\delta}{a}\right)^2$$

L'énergie totale de déformation est donc donnée par

$$E_{def} = d_{def} \cdot Volume$$

On suppose que le volume affecté par la déformation est a^3 :

$$E_{def} = d_{def} \cdot a^3 = E \cdot \delta^2 \cdot a$$

Conformément au principe de conservation de l'énergie : $E_{def} = W_{indent}$, on obtient donc :

$$F \sim E\delta a$$

En reprenant l'équation 3.2 on obtient :

$$F \sim E \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \cdot R^{\frac{1}{2}}$$

3.6.2 Application du modèle de Hertz dans notre système

Le modèle de Hertz a initialement été développé pour modéliser le contact entre solides élastiques semi-infinis. Notre système est un cas un peu différent puisqu'il s'agit du contact où une des sphères est infiniment rigide et l'autre couverte d'une couche d'un matériau qui présente un comportement plus complexe qu'une réponse élastique linéaire, il convient donc de discuter ces différences :

Matériau d'épaisseur finie

Comme nous venons de le voir, le modèle de Hertz considère qu'un volume a^3 de gel est déformé. Or dans notre système, le rayon de l'aire de contact est du même ordre de grandeur que l'épaisseur du gel. Cela signifie que lors de la mesure on "sent" le substrat sous-jacent ce qui entraîne une surestimation de la valeur du module de Young. Pour pallier ce problème, nous utilisons une correction initialement développée pour les mesures mécaniques par AFM.

Cette correction proposée par Dimitriadis et al. (2002) prend la forme d'un polynôme en $\chi = \frac{\sqrt{R\delta}}{e}$ qui multipliera la formule originale de Hertz telle que

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{\frac{1}{2}} \delta^{\frac{3}{2}} \left[1 - \frac{2\alpha_0}{\pi} \chi + \frac{4\alpha_0^2}{\pi^2} \chi^2 - \frac{8}{\pi^3} \left(\alpha_0^3 + \frac{4\pi^2}{15} \beta_0 \right) \chi^3 + \frac{16\alpha_0}{\pi^4} \left(\alpha_0^3 + \frac{3\pi^2}{5} \beta_0 \right) \chi^4 \right] \quad (3.3)$$

Avec

$$\alpha_0 = -\frac{1.2876 - 1.4678\nu + 1.3442\nu^2}{1 - \nu}$$

$$\beta_0 = \frac{0.6387 - 1.0277\nu + 1.5164\nu^2}{1 - \nu}$$

Nous avons supposé que le module de Poisson (ν) des gels était de 0.5 pour la détermination des constantes α et β . L'effet de ce choix sur les résultats obtenus sera étudié en partie 4.1.2.

La figure 3.21 montre le rapport entre la force nécessaire pour indenter un matériau d'épaisseur finie ($F_{Dimitriadis}$) et la force nécessaire pour indenter un matériau semi-infini (F_{hertz}) en fonction de l'épaisseur de la couche mince pour une indentation de 100 nm. On peut voir que la correction est de 40% pour une épaisseur de l'ordre de 1.5 μm mais qu'elle est de l'ordre de cinq pour une épaisseur inférieure à 0.3 μm .

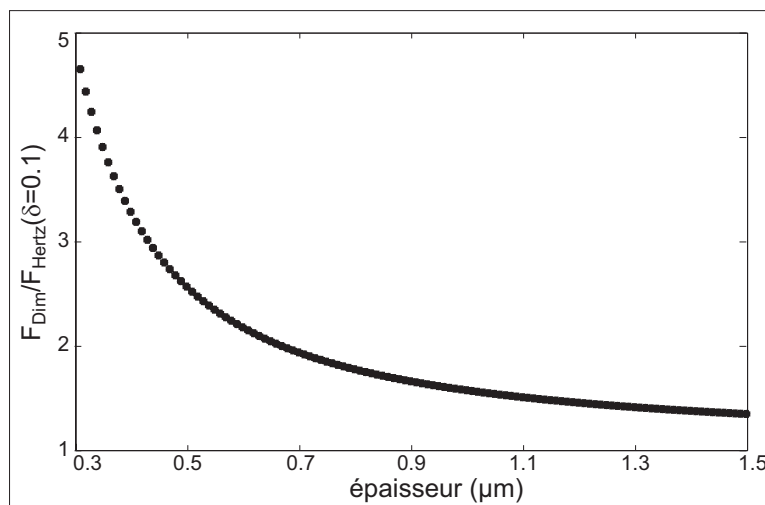


FIGURE 3.21 – Valeur du facteur correctif de Dimitriadis en fonction de l'épaisseur pour une indentation de 0.1 μm

Limitation sur le rapport $\frac{a}{R}$

Le degré de non linéarité des gels d'actine est encore une question ouverte, il ne fait cependant aucun doute qu'il ne s'agit pas d'un matériau purement Hookéen. Quel impact cela a-t-il sur la validité du modèle? La principale source d'erreur pourrait venir d'une erreur sur la définition de l'aire de contact donnée par l'équation 3.2.

Lin et al. (2009) ont calculé par la méthode des éléments finis l'indentation d'une sphère infiniment rigide dans un matériau plan dont l'élasticité obéit au modèle hyperélastique de Mooney-Rivlin. Il montre que pour $\frac{\delta}{R} < 0.4$, l'estimation de la surface de contact donnée par le modèle de Hertz est correcte, même pour un matériau dont l'élasticité est non linéaire. A titre de précaution nous avons donc exclu tous les gels dont la courbe d'indentation ne satisfaisait pas à ce critère.

Homogénéité et isotropie

Le modèle de Hertz a été développé pour des matériaux homogènes et isotropes. Qu'en est-il des gels branchés d'actine que nous étudions?

L'homogénéité d'un gel d'actine dépend de l'échelle à laquelle on l'observe. En effet si on se place à une échelle de l'ordre de la taille de maille du matériau, on observera des espaces vides parcourus par des filaments, donc une hétérogénéité très forte. A une échelle plus grande, ces hétérogénéités deviennent moins sensibles jusqu'à ce que l'on puisse avoir une vision continue du matériau qui pourra alors être considéré comme homogène. Typiquement notre échelle d'observation est le rayon de la zone de contact (a). En prenant un gel d'épaisseur $0.5 \mu\text{m}$ (un rayon équivalent de l'ordre de $1 \mu\text{m}$ ($\frac{1}{R_{eq}} = \frac{1}{R_{bille}} + \frac{1}{R_{bille+e}}$)) et une indentation typique de 100 nm on obtient via l'équation 3.2 un rayon de contact de 300 nm . Comme nous le verrons dans le chapitre prochain, notre taille de maille est de l'ordre de 50 nm , l'échelle d'observation est donc supérieure à la dimension des hétérogénéités et on peut raisonnablement supposer le matériau homogène.

On peut également se poser la question de l'isotropie du matériau. Les observations en microscopie électronique de gel d'actine à l'intérieur de lamellipode (Svitkina et al., 1997) montrent une forte anisotropie due à une orientation des filaments dont les bouts barbés sont en direction de la membrane. Pour les gels reconstitués in vitro, les observations de Achard et al. (2010) montrent que les gels ne croisent pas seulement perpendiculairement à la surface mais également parallèlement, laissant supposer que les filaments ne pointent pas tous dans la même direction, donnant au matériau des propriétés plutôt isotropes.

3.7 Déroulement de la mesure

Les gels sont polymérisés à la surface des particules colloïdales suivant le protocole décrit dans la section 3.2.2. Un échantillon contient deux types de billes, celles couvertes d'actine et celles couvertes de BSA. Pour procéder aux mesures, on introduit l'échantillon dans une chambre de dimension $22 \cdot 1 \cdot 0.2 \text{ mm}$ par capillarité que l'on place ensuite dans le setup magnétique. Un champ magnétique constant de 3 mT est appliqué pour former et maintenir les chaînes entre chaque acquisition.

Une acquisition est l'observation d'une chaîne lors d'un cycle de compression-décompression d'une durée totale de 10 secondes. Pour que l'étalement des points soit homogène, l'amplitude du champ magnétique varie comme $B(t) = \left(\frac{t}{n}\right)^2 \cdot 80\text{mT}$ avec $n=135$. On mesure l'évolution de toutes les distances inter particules et les images de fluorescence prises à l'issue de chaque acquisition nous permettent de sélectionner les courbes force-distance des contacts act-BSA . Ces contacts sont les seuls qui nous permettent de remonter aux propriétés intrinsèques des gels d'actine, car ce sont les seuls dont on peut calculer la surface.

Au vu de la rapidité d'une acquisition, on est capable d'en réaliser une trentaine en 45 minutes, ce qui permet de sonder de 20 à 150 gels selon la qualité de la préparation.

Chapitre 4

Résultats

Nous allons maintenant exposer les résultats obtenus durant cette thèse. Nous commencerons par la présentation d'une courbe force déplacement typique ainsi que par la présentation de l'échantillon de référence. Au travers de cet échantillon, nous reviendrons sur les multiples validations, à la fois des protocoles expérimentaux mais également de la méthode de traitement des données auxquelles nous avons procédé lors du développement de cette nouvelle technique de mesure. En effet, les performances et les perspectives qu'offre aujourd'hui notre montage expérimental sont grandement dues au travail accompli durant cette thèse.

Nous passerons ensuite à ce qui représente le cœur de ma thèse : l'étude systématique des gels d'actine branchés. Nous nous sommes intéressés d'une part à l'influence de la stabilisation par phalloïdine et d'autre part, à la relation qui existe entre le module de Young des gels et la concentration en gelsoline et en Arp2/3 lors de la croissance du gel.

Pour finir, nous présenterons deux méthodes de mesure indirecte des propriétés non linéaires des gels auxquelles nous avons procédé. D'une part le suivi de l'évolution du module de Young avec l'augmentation des contraintes internes et d'autre part, la mesure de ce que nous appelons un pseudo module de Young différentiel. Ces résultats seront discutés dans le chapitre suivant dans le cadre des modèles mécaniques présentés dans le chapitre 2.

4.1 Une nouvelle méthode de mesure

4.1.1 Résultats typiques

Une courbe de force

Les données brutes obtenues dans cette technique sont des courbes force-distance. Un exemple typique est donné figure 4.1. On distingue la compression (en rouge) et la décompression (en bleu) qui suit. L'hystérésis entre la compression et la décompression est minimale, nous nous y intéresserons dans la partie 4.1.2. Chaque courbe est ajustée par le modèle de Hertz corrigé présenté dans la section 3.6 afin de déterminer le module de Young, E . Les courbes sont ajustées sur le domaine [0-500] pN afin de pouvoir comparer les résultats entre les différentes conditions. En effet, la force dépendant à la puissance quatre de la distance centre à centre, la force maximum appliquée sur des gels épais est moins importante. Le choix d'une borne en force plutôt qu'en déformation ou en contrainte a été

dicté par les problèmes de contact sphérique qui induisent une déformation inhomogène du gel.

Si le fit est bon pour la majeure partie de la courbe, il est moins satisfaisant pour de faibles forces, comme discuté au paragraphe 4.1.2, ce qui entraîne une mauvaise estimation de l'épaisseur du gel. Pour déterminer l'épaisseur des gels, nous ajustons donc la courbe sur le domaine [0-100] pN. Alternativement, nous avons déterminé l'épaisseur par la moyenne de la distance entre les surfaces des billes pour de très faibles forces [2-5] pN. Ces deux méthodes donnent des résultats très voisins (voir courbe en annexe C).

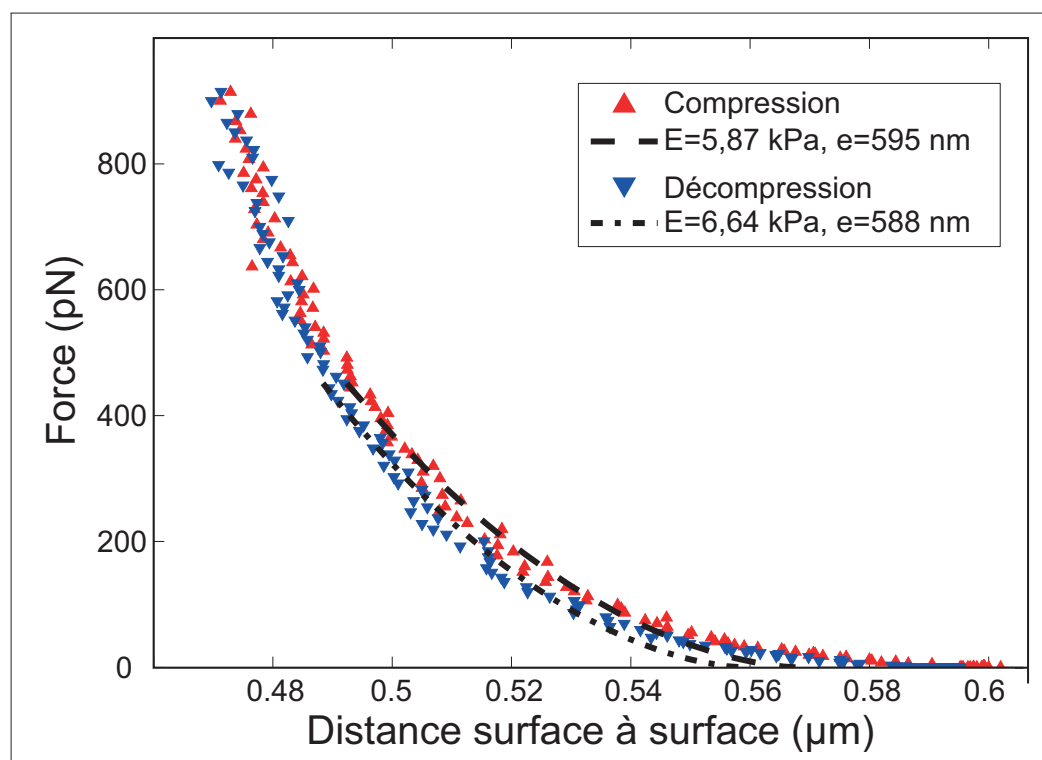


FIGURE 4.1 – Exemple d'une courbe force-déplacement d'un gel d'actine dendritique

La courbe force déplacement présentée figure 4.1 appartient à un échantillon que nous allons maintenant étudier en détail et qui compte 129 courbes force-distance. Il a été polymérisé en présence de 180 nM d'Arp2/3 et 90 nM de gelsoline ; cette concentration sera désignée comme condition *classique* par la suite.

Résultats quantitatifs

Chaque courbe force-distance d'un échantillon donne accès au module de Young, à l'épaisseur et l'intensité de fluorescence d'un gel d'actine. Les histogrammes de l'échantillon de référence sont donnés en figure 4.3. Les valeurs moyennes sont résumées dans le tableau ci-dessous :

$$\begin{aligned}
 \langle E \rangle &= 5.2 \pm 1.8 \text{ kPa} \\
 \langle e \rangle &= 651 \pm 132 \text{ nm} \\
 \langle f \rangle &= 840 \pm 192 \text{ U.A.}
 \end{aligned}$$

Le module de Young moyen mesuré ici est du même ordre de grandeur que les valeurs mesurées par Marcy et al 2006 (3.7 kPa) et par Chaudhuri et al. 2007 (1.0 kPa et jusqu'à 5 kPa en présence de pré-contraintes) sur des gels équivalents. Le grand avantage de notre technique est qu'elle offre de larges statistiques permettant d'améliorer considérablement la précision.

Nous avons procédé à une évaluation de la densité d'actine des gels en mesurant la fluorescence de solutions d'actine-G de concentration connue placées entre lame et lamelle avec des billes de 4 μm comme espaceurs. La variation de l'intensité lumineuse en fonction de la concentration étant bien linéaire, on peut extrapoler la droite jusqu'à la valeur d'intensité typique de nos gels (1000 UA), ce qui nous donne une concentration de l'ordre de 150 μM (fig 4.2). En reprenant la formule vue au chapitre 2.2 $\xi = (c \cdot a)^{0.5}$ on obtient une taille de maille typique de 50 nm.

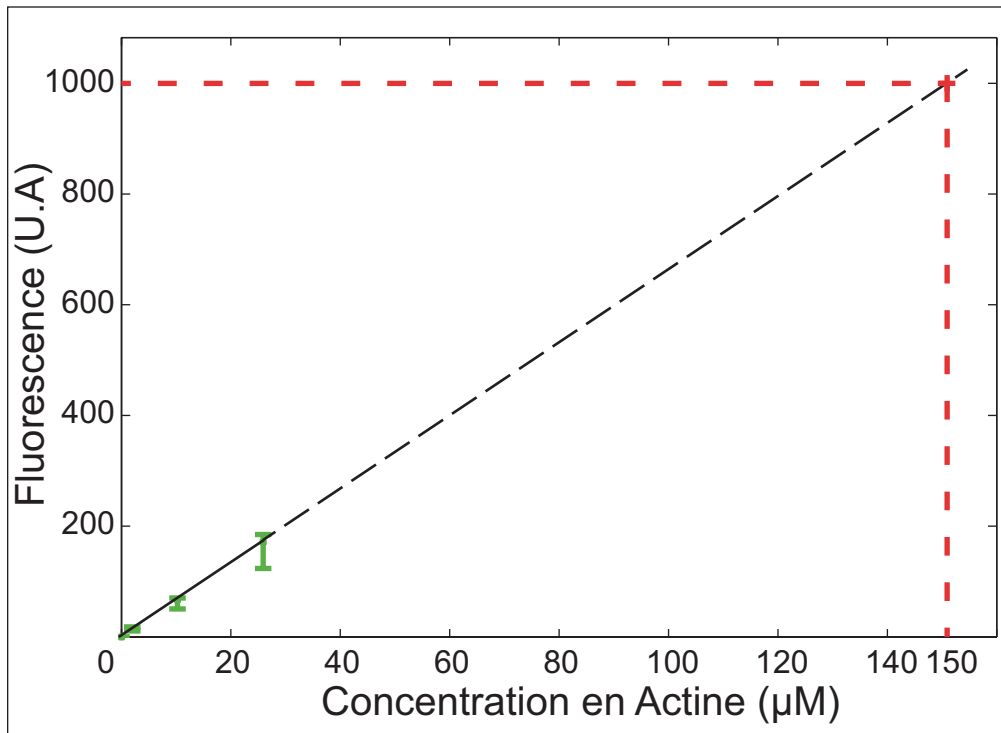


FIGURE 4.2 – Evaluation de la densité de nos gels.

La figure 4.3 montre bien l'intérêt d'avoir des statistiques importantes lors de l'étude d'un système aussi sensible que les gels d'actine reconstitués. En effet, la variabilité gel à gel se traduit par un facteur 5 entre les valeurs extrêmes de la distribution et en règle générale, dans nos expériences, les écarts types sont de l'ordre de la moitié des moyennes. L'intervalle de confiance à 95% de nos mesures ($2 * \text{std} / \sqrt{\text{nombre de mesures}}$) nous donne une incertitude de l'ordre de $\pm 10\%$ des moyennes.

Dans cette technique, le système de mesures est constitué par une paire de colloïdes, permettant que dans un champ de microscope, plusieurs mesures soient réalisées simultanément. On atteint ainsi très rapidement plusieurs dizaines de gels testés en se déplaçant simplement dans la chambre d'expérience. Chaque mélange de croissance conduit donc à

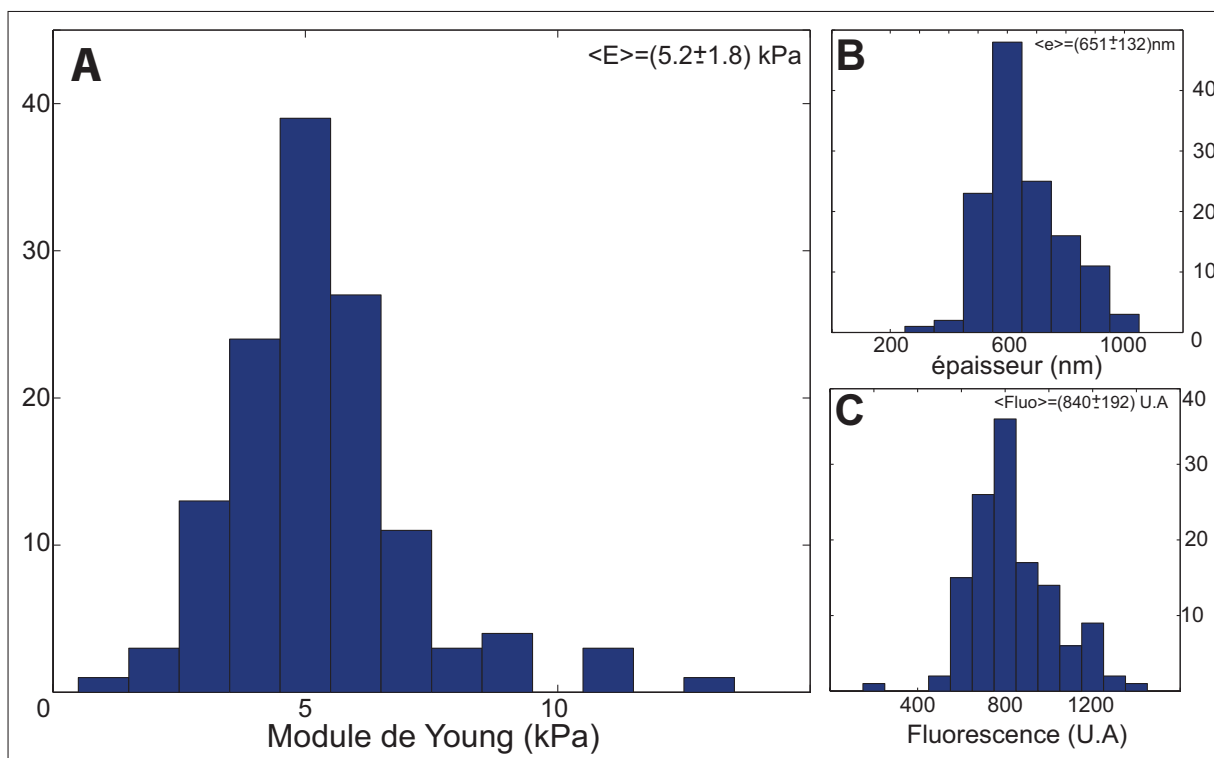


FIGURE 4.3 – Histogrammes de l'échantillon de référence à 180 nM d'Arp2/3 et 90 nM de gelsoline. A, modules de Young. B, épaisseur. C, intensité de fluorescence

une série de mesures caractérisée par une valeur moyenne dont l'erreur type est considérablement réduite par le nombre élevé de mesures. On peut illustrer la puissance statistique de notre montage expérimental en mentionnant le nombre de module de Young mesuré au cours de ma thèse : plus de 8000 ! A titre de comparaison, une dizaine de mesures avaient été publiées jusqu'à présent.

Cette précision de mesure nous a permis de réaliser une étude systématique de la mécanique des gels d'actine en fonction des concentrations de protéines dans le milieu de croissance. Nous avons, par exemple, pu mettre en évidence le lien entre l'architecture et la rigidité du réseau, ce qui aurait été impossible avec des incertitudes aussi grandes que les valeurs moyennes. La description des résultats de cette étude fera l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

Une grande partie de mon travail de thèse a consisté en un certain nombre de validations expérimentales portant sur des domaines extrêmement variés comme l'électronique, le magnétisme, les colloïdes et bien évidemment la mécanique et la biochimie. On peut citer comme exemple l'évaluation du bruit de mesure lié à l'utilisation d'éléments inductifs, l'optimisation des mesures optiques en champ clair et en fluorescence, l'ajustement du protocole de polymérisation des gels, l'exploration des limites de validité de l'essai mécanique de compression-décompression, le choix des colloïdes utilisés etc.

Nous allons maintenant étudier les validations expérimentales les plus intéressantes, c'est-à-dire celles qui sont en rapport direct avec le polymère d'actine et le modèle utilisé.

4.1.2 Validation

Validation expérimentale

Equilibre mécanique au cours de la mesure

Comme nous l'avons vu dans la section 3.1.1, le calcul de la force mécanique est obtenu grâce à l'égalité $F_{mag} = -F_{meca}$. Cet équilibre suppose que la déformation imposée au gel soit suffisamment lente pour que le système soit à l'équilibre mécanique à tout instant. "Suffisamment" lente signifie que la déformation doit être plus lente que le temps caractéristique du système. L'une des manières de mesurer ce temps caractéristique est de soumettre un gel d'actine à un essai de fluage. Cet essai classique en mécanique consiste à appliquer un échelon de force et de suivre l'évolution de la déformation avec le temps ; selon le modèle de Voigt Kelvin, la déformation évolue en $\epsilon = \epsilon_0 \cdot \exp(-t/\tau)$ avec τ le temps caractéristique.

La figure 4.4 montre la réponse d'un gel à un échelon de champ magnétique (de 1 à 70 mT) enregistré avec une caméra rapide (Neo sCMOS, Andor Technology). On peut voir que le temps caractéristique à la charge et de la décharge est de l'ordre de la dizaine de millisecondes. L'équilibre mécanique est donc bien respecté puisque le temps caractéristique de nos gels est au moins mille fois inférieur au temps typique d'acquisition. On note sur cette figure une nette différence entre les temps caractéristiques de la charge et de la décharge. Elle peut probablement être attribuée à des phénomènes d'adhésion.

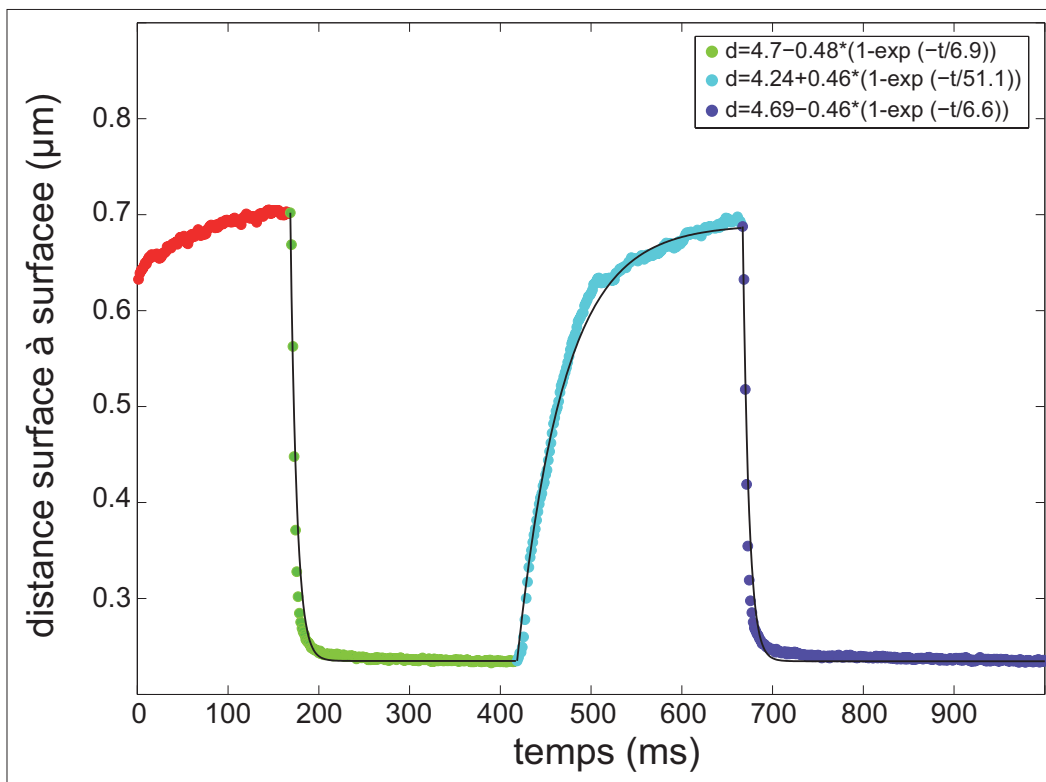


FIGURE 4.4 – Evolution de la distance entre particules lors de l'application d'un signal de champ magnétique carré de 1 à 70 mT. Les points représentent les données et le trait plein les fit par le modèle de Voigt Kevin

Hystérésis

Comme on peut le voir sur la figure 4.1 l'hystérésis est minimum entre la compression et la décompression. De manière générale la courbe de décharge se trouve légèrement en dessous de la courbe de charge et le rapport E_{aller}/E_{retour} est de l'ordre de 0.8 (dans le cas présent = 0.88). Cette légère différence peut être due à des phénomènes réversibles comme l'adhésion entre le gel et la bille recouverte de BSA et/ou des phénomènes irréversibles comme une réorganisation du réseau.

La présence d'adhésion réversible est suggérée par l'essai de fluage, puisque celui-ci montre une différence entre le temps caractéristique de charge et de décharge. Cependant, au vu de la rapidité du détachement (de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes), la perte d'énergie peut être négligée. Dans la suite de ce manuscrit nous ne nous intéresserons qu'aux valeurs du module mesuré lors de la charge.

Les phénomènes irréversibles sont plus problématiques notamment si la différence entre E_{aller} et E_{retour} est due à un passage à une déformation plastique du matériau. Ce problème peut néanmoins être largement exclu : d'une part la répétition de la mesure sur un même gel donne le même résultat (fig 4.5.A), et d'autre part la variation du module au cours des mesures sur un même échantillon (fig 4.5.B) est bien en deçà de l'erreur type associée au module moyen. Il faut garder en tête qu'à chaque rampe de force, toutes les chaînes de l'échantillon sont soumises à un cycle de compression/décompression, un tassement du réseau se traduirait donc par une augmentation importante du module au fur et à mesure de l'expérience.

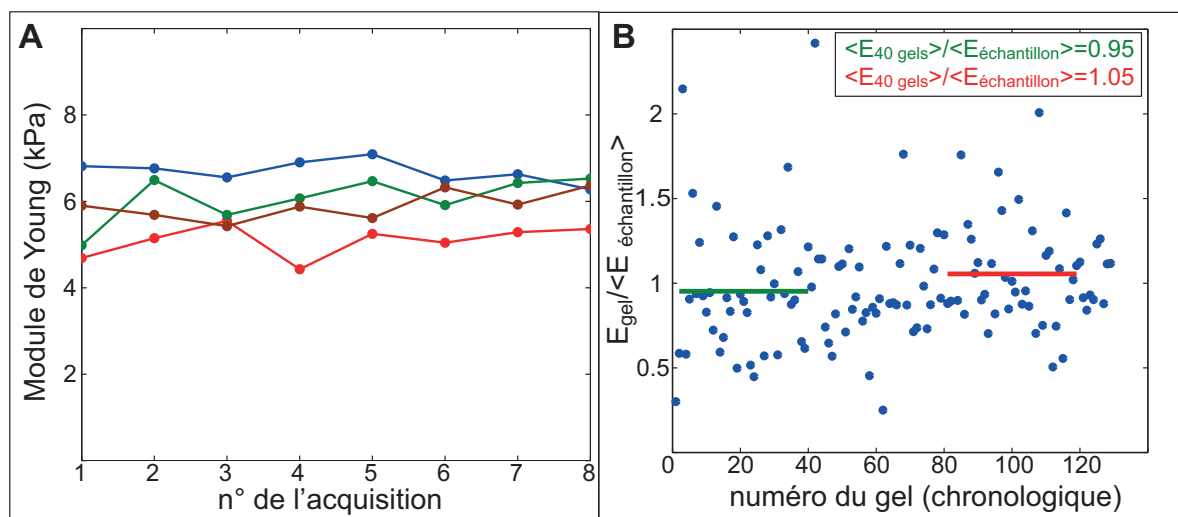


FIGURE 4.5 – A : Evolution du module de Young de quatre gels soumis à 8 acquisitions successives ; B : Evolution du rapport module des gels sur module moyen de l'échantillon avec le temps

Liaisons doubles

Nous avons vu que la relation force distance d'un contact entre une bille couverte d'actine et une bille couverte de BSA était bien capturée par le modèle de Hertz et sa variation en $d^{3/2}$. Le contact entre deux billes couvertes d'actine suit un autre comportement, une courbe force déplacement typique est donnée en figure 4.6.

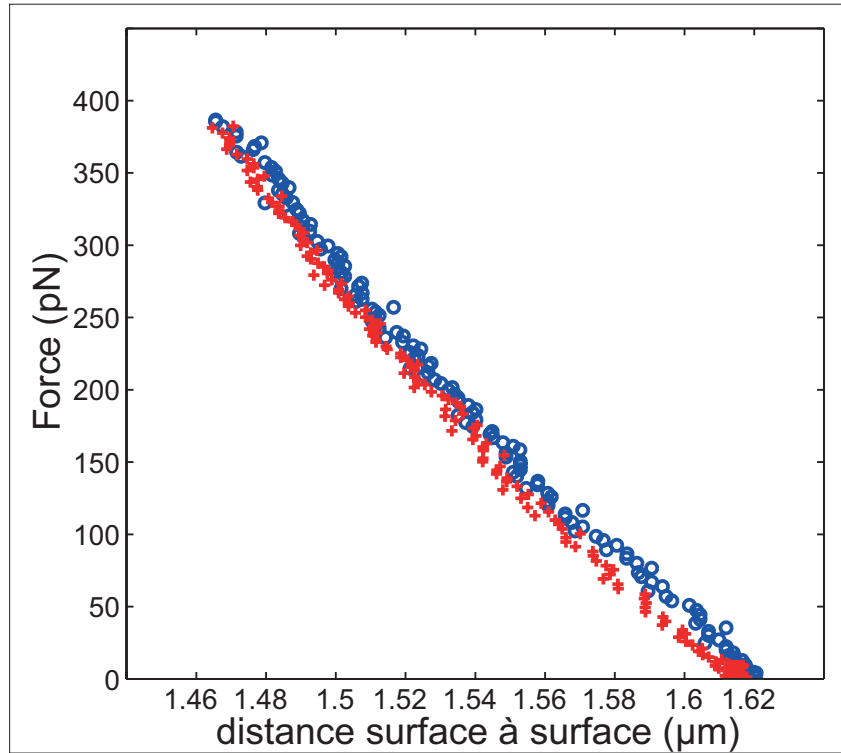


FIGURE 4.6 – Courbe force déplacement typique d’une liaison double

On constate une variation linéaire de la distance inter particules en fonction de la force. Ce cas est typique d’un ressort avec $F = k\Delta x$ où F est la force de rappel, k la constante de rigidité du ressort et Δx la variation de longueur du ressort. On interprète cette variation linéaire par le fait que les deux gels d’actine s’interpénètrent dès la formation de la chaîne et ne se désenchevêtrent pas par la suite. Cela a pour conséquence une très faible variation de la surface de contact (S) entre les gels lors de mesures ultérieures donnant lieu au comportement de type ressort. Rigoureusement on a $k = \frac{E}{S}$. N’ayant pas accès à l’aire de contact entre les gels, on est incapable de remonter au module de Young des gels d’actine à partir des liaisons doubles. Nous ne nous sommes donc pas intéressés aux liaisons doubles.

Vitesse de croissance des gels

Nous avons réalisé des expériences dans lesquelles le milieu reconstitué est divisé en sept échantillons dont on bloque la croissance entre 3 et 30 minutes par dilution dans la phalloïdine. Nous reviendrons dans la section 4.3.1 sur l’effet des contraintes internes sur le module de Young. Intéressons nous ici à l’évolution de l’épaisseur moyenne des gels en fonction du temps et des conditions biochimiques.

En effet le temps de croissance des échantillons est une donnée critique de nos expériences. S’il est trop long, les gels risquent majoritairement de se briser et s’il est trop court, les gels sont trop fins pour être correctement analysés par le modèle de Hertz corrigé. L’épaisseur d’un gel étant liée au temps de croissance mais également aux conditions biochimiques et notamment à la concentration en Arp2/3, un travail d’ajustement a été nécessaire pour obtenir des gels d’épaisseurs comprises entre $0.4 \mu\text{m}$ à $1.2 \mu\text{m}$.

Sur la figure 4.7 on peut voir l'évolution de l'épaisseur moyenne des gels en fonction du temps de croissance de deux échantillons polymérisés en présence de 44 nM d'Arp2/3 et de 400 nM. Sur la première partie de la courbe (jusqu'à 15 minutes), les deux concentrations ont un comportement similaire : une phase de croissance rapide dans les premières minutes suivie d'une croissance linéaire plus lente. La différence réside principalement dans la vitesse de croissance, on voit que l'échantillon à 44 nM d'Arp2/3 croît beaucoup plus vite que l'échantillon à 400 nM. C'est cette différence qui nous a conduits à adapter le temps de croissance de nos échantillons en fonction de la concentration en Arp2/3 : pour des concentrations allant de 10 à 100 nM d'Arp2/3, les temps de croissance sont de l'ordre de 5-8 minutes et pour les échantillons à 180 et 400 nM, le temps de croissance est de 15 minutes. Sur la deuxième partie de courbe (entre 15 et 30 minutes) pour l'échantillon à 44 nM, on voit que la dispersion des points augmente. Cela est dû aux brisures de gel que l'on voit apparaître à partir de 15 minutes et qui perturbent la mesure d'épaisseur. Nous reviendrons sur l'événement de brisure et ses conséquences mécaniques dans la section 4.3.1.

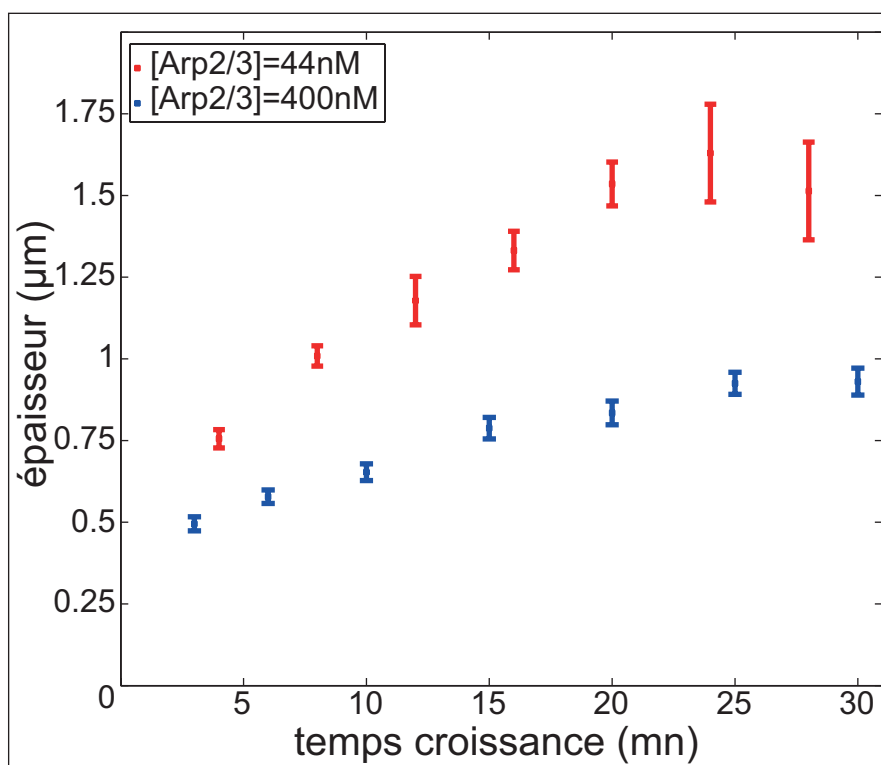


FIGURE 4.7 – Evolution de l'épaisseur moyenne des gels en fonction du temps pour des concentrations en Arp2/3=44 nM et 400 nM

Comme nous le verrons, les gels polymérisés à 44 nM d'Arp2/3 sont plus mous que ceux obtenus à 400 nM. La différence de vitesse de croissance pourrait être liée à cette différence de rigidité. En effet, si le gel est plus mou, il est plus facile pour la couche au contact de la bille de repousser les couches externes, ce qui aboutit à des gels plus épais. D'autres facteurs peuvent jouer, notamment la diffusion des protéines permettant la construction du réseau (Noireaux et al., 2000).

Utilisation du modèle de Hertz

Qualité du fit

Revenons sur la figure 4.1 pour nous intéresser à la qualité du fit. En effet, bien qu'à haute force le modèle de Hertz soit tout à fait satisfaisant (pour l'échantillon de référence le coefficient de corrélation moyen est de 0.99), il capture moins bien le comportement à basse force. Deux effets non exclusifs peuvent être à l'origine de cet écart au modèle.

D'une part la couche extérieure de gel peut présenter des irrégularités. Par exemple la présence de filaments d'actine isolés ayant poussé très rapidement par effet de "funneling" (Carlier and Pantaloni, 1997) peut être à l'origine d'une force répulsive entre les particules jusqu'à ce que la force attractive soit suffisante pour les faire plier. Les irrégularités peuvent aussi prendre la forme d'une rugosité de la couche extérieure. Cette rugosité fait écho aux travaux de Achard et al. (2010) qui ont montré que la croissance d'un gel d'actine avec la machinerie Arp2/3 démarrerait à partir de quelques filaments sur la surface couverte d'activateur. Ces sous-réseaux s'étendent alors latéralement et verticalement jusqu'à ce qu'ils se rencontrent et s'enchevêtrent. Compte tenu de ce mécanisme, il est possible que l'extérieur de nos gels présente une certaine rugosité.

L'autre origine de l'écart entre les données et le fit à basse force peut être attribuée au fait que lorsque le volume de gel sondé est du même ordre de grandeur que la taille de maille (50 nm voir précédemment), la mesure est très sensible à l'hétérogénéité du réseau. Dans la théorie de Hertz, le volume sondé étant égal au rayon de l'aire de contact soit $a = (R_{eq}\delta)^{0.5}$ lorsque l'indentation est de 20 à 30 nm on obtient un rayon de contact d'une centaine de nanomètres, soit à peine une ou deux mailles de réseau. Cet effet peut être illustré en comparant le fit à faible force (50 pN) et celui à 500 pN. On peut voir sur la figure 4.8 que le fit classique est nettement moins dispersé que celui à faible force. Au début de ma thèse nous avons rencontré un problème similaire avec les colloïdes magnétiques de 1 μm de diamètre (MyOne, Invitrogen). Dans ce cas, le rayon équivalent est de l'ordre de 0.3 μm , soit un rayon de zone de contact inférieur de 100 nm et les données obtenues étaient très dispersées.

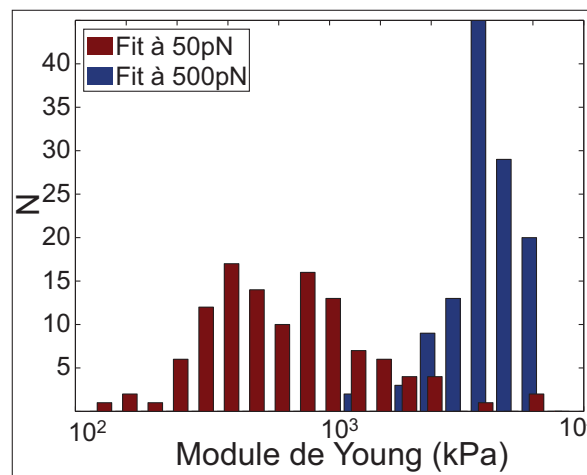


FIGURE 4.8 – Histogramme des modules de Young obtenus par le fit des points jusqu'à 50 pN (rouge) et jusqu'à 500 pN (bleu)

Validation de la correction pour épaisseur finie

Le modèle de Hertz suppose que le milieu déformé est semi-infini. Dans nos expériences, le rayon de la zone de contact étant du même ordre que l'épaisseur des gels, la bille dure sous-jacente est "sentie" lors de la déformation, et nous avons appliqué au modèle de Hertz une correction due à Dimitriadis. Pour tester la validité de cette correction nous avons fité les courbes d'un échantillon avec le modèle de Hertz corrigé et non-corrigé et nous avons regardé la corrélation des modules de Young obtenus avec l'épaisseur. Pour le modèle de Hertz original, la probabilité de l'hypothèse nulle, c'est à dire la probabilité qu'il n'y ait pas corrélation entre le module obtenu et l'épaisseur est de $p = 10^{-5}$. Pour les données obtenues avec le fit corrigé par le polynôme de Dimitriadis, la probabilité de l'hypothèse nulle est de 0.4, soit non significative (fig 4.9.A). Le terme correctif de l'épaisseur semble donc bien remplir son rôle.

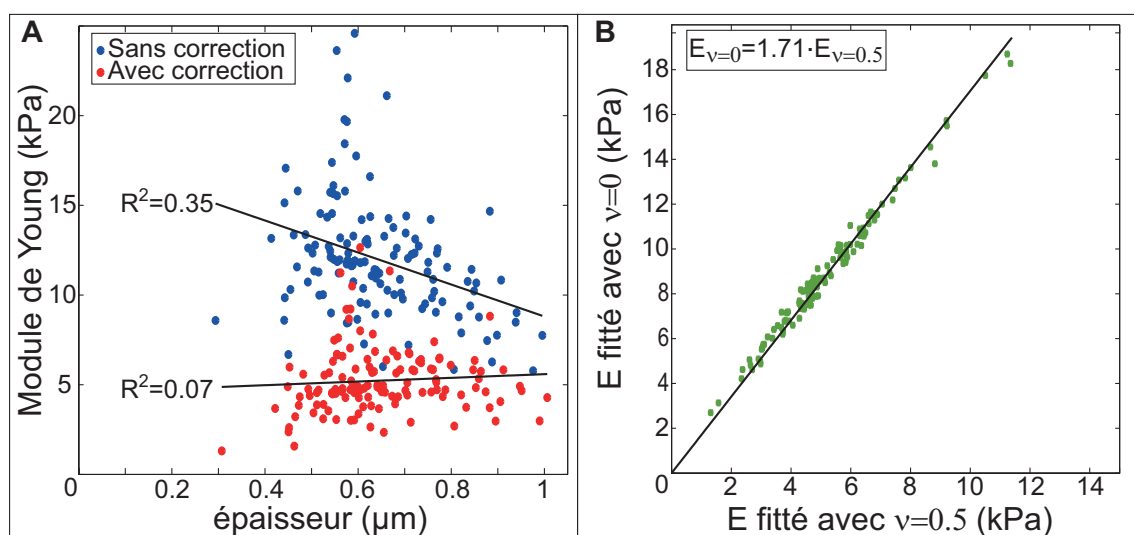


FIGURE 4.9 – A : Comparaison des modules de Young obtenus avec un fit des données par le modèle de Hertz (bleu) et par le modèle de Hertz corrigé pour l'épaisseur finie (rouge), R^2 est le coefficient de corrélation linéaire ; B : Comparaison du module obtenu par le fit avec $\nu = 0$ et $\nu = 0.5$

La correction pour l'épaisseur finie dépend de la compressibilité du matériau par le coefficient de Poisson ν . Si pour des gels enchevêtrés une mesure de la compressibilité a été effectuée (et donne $\nu \sim 0.5$ (voir section 2.3.1)), la valeur du coefficient de Poisson n'est pas connue pour des gels denses branchés. D'ailleurs dans la littérature, certains auteurs choisissent $\nu = 0$ et d'autres $\nu = 0.5$ (Dafalias et al., 2008).

Par analogie avec les gels enchevêtrés, nous avons choisi $\nu = 0.5$ dans la formule correctrice et nous avons évalué l'impact de ce choix sur le module élastique évalué dans nos expériences. On peut constater sur la figure 4.9.B que la valeur des modules n'est modifiée que de manière proportionnelle ($E_{\nu=0} = 1.7 * E_{\nu=0.5}$). Par conséquent, la comparaison entre les modules élastiques obtenus dans différentes conditions expérimentales n'est pas affectée par le choix du coefficient de Poisson.

4.2 Etude systématique

4.2.1 Impact de la phalloïdine

Après la phase de croissance, les billes sont diluées dans de la phalloïdine de manière à ce que les gels ne dépolymérisent pas durant tout le temps de la mesure. Cette drogue empêche le désassemblage des monomères en augmentant l'énergie de liaison. La croissance des gels durant les acquisitions pose des problèmes expérimentaux, mais nous avons tout de même étudié des gels sans dilution du milieu de croissance et sans ajout de phalloïdine.

Adaptation du protocole

Le problème posé par les mesures mécaniques sur les gels en croissance est que si l'on procède comme pour un échantillon classique, c'est-à-dire en appliquant un champ constant de 3 mT, puis en effectuant une série d'acquisitions, la croissance des gels est perturbée par les billes nues en vis-à-vis et l'aire du contact entre elles ne correspond plus à la surface de Hertz. Comme l'aire de contact n'est pas connue, le module de Young du gel ne peut pas être extrait de ces mesures.

Pour pallier ce problème, nous avons utilisé le protocole suivant : chercher dans l'échantillon deux billes proches l'une de l'autre, former la liaison avec un champ de 3mT et procéder immédiatement à une acquisition avant de supprimer le champ magnétique puis recommencer. Bien que cette méthode nous permette à nouveau d'obtenir des résultats analysables, elle nuit fortement aux statistiques puisque seulement vingt-deux gels en huit échantillons ont pu être sondés.

Résultats de l'échantillon sans phalloïdine

La stabilisation par la phalloïdine entraîne l'augmentation de la longueur de persistance des filaments. Nous avons utilisé cette propriété pour nous intéresser au lien qui existe entre la rigidité des filaments individuels et la réponse mécanique du gel. Pour cela, nous avons comparé les échantillons non stabilisés avec un échantillon stabilisé polymérisé à partir du même mélange de protéines. L'histogramme des deux échantillons est donné en figure 4.10.

L'échantillon sans phalloïdine a comme module $\langle E_{no\ phallo} \rangle = [3.2 \pm 1.5]$ kPa et celui avec $\langle E_{phallo} \rangle = [6.2 \pm 2.9]$ kPa. La dilution dans la phalloïdine augmente donc d'un facteur deux le module des gels.

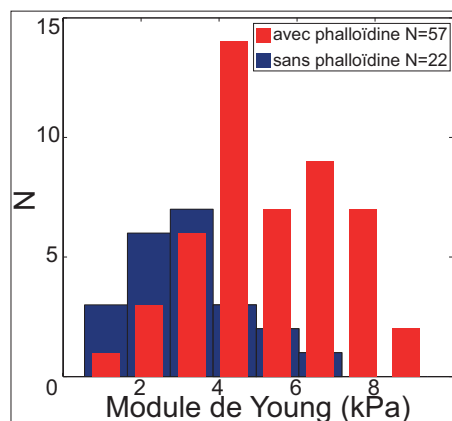


FIGURE 4.10 – Histogramme du module de Young des gels avec et sans phalloïdine

Relation entre la rigidité des éléments et celle de leur assemblage

Pour comprendre le lien entre les propriétés microscopiques des filaments et la rigidité du gel, revenons sur le lien entre les protéines présentes dans notre système et la longueur de persistance des filaments. Deux protéines modifient la force du lien entre les monomères : la phalloïdine qui le renforce, elle augmente donc la longueur de persistance et la cofiline qui l'affaiblit, ce qui diminue L_p .

La différence de longueur de persistance de filaments d'actine stabilisés par de la phalloïdine et de filaments isolés a été étudiée par Isambert et al. (1995). Ils ont utilisé le fait que pour un filament contraint en 2 D, il est possible de relier la longueur de persistance L_p à la moyenne de la fonction de corrélation de l'angle tangent au filament ($\langle C(s) \rangle$) le long de l'abscisse curviligne s (eq :4.1). Avec la phalloïdine, ils trouvent $L_p = (18 \pm 1) \mu\text{m}$ et pour un filament d'actine lié au nucléotide ADP $L_p = (9 \pm 0.5) \mu\text{m}$ (Isambert et al., 1995).

$$\langle C(s) \rangle = (\cos(\theta(s) - \theta(0))) = \exp\left(\frac{-s}{2 \cdot L_p}\right) \quad (4.1)$$

L'effet de la cofiline sur la longueur de persistance des filaments a été étudié par McCullough et al. (2008). Avec la même méthode, ils mesurent la rigidité de filaments en présence d'une forte concentration en cofiline ($[\text{cofiline}]/[\text{actine}] \sim 10$) et trouvent $L_p = 2.2 \pm 0.026 \mu\text{m}$ (McCullough et al., 2008). Des valeurs sensiblement plus importantes ($L_p = 3.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$) sont mesurées dans une étude plus récente des mêmes auteurs (McCullough et al., 2011).

Nous avons voulu mesurer la longueur de persistance des filaments dans nos conditions expérimentales exactes : la stabilisation par la phalloïdine se fait à $[\text{pha}]/[\text{act}]=3$, durant la croissance des échantillons et lors des mesures sans phalloïdine, le rapport $[\text{cofiline}]/[\text{actine}]=1$, ce qui est nettement inférieur au rapport utilisé par McCullough et al. (2008). Lors des mesures sur les échantillons stabilisés, le rapport $[\text{cofiline}]/[\text{actine}] = 0.1$ et le rapport $[\text{phalloïdine}]/[\text{actine}] = 3$, l'interaction de ces protéines sur un filament d'actine étant similaire ($K_d = 140 \text{ nM}$ pour cofiline/actine (Blanchoin and Pollard, 1998), $K_d = 114 \text{ nM}$ pour phalloïdine actine (De La Cruz and Pollard, 1994)) la phalloïdine est probablement très majoritaire sur les filaments dans cette condition.

La littérature n'évoquant pas l'interaction de la cofiline et de la phalloïdine, nous avons nous-mêmes procédé à une mesure de la longueur de persistance d'un filament assemblé ratio actine/cofiline (1 : 1), puis stabilisé par de la phalloïdine. Pour étalonner la mesure, nous avons mesuré la longueur de persistance d'un filament uniquement stabilisé par de la phalloïdine (fig 4.11.A). La pente de la fonction moyenne de corrélation d'angle de filaments filmés entre lame et lamelle séparées par des espaceurs de $2 \mu\text{m}$ donne pour de la phalloïdine seule $L_p = 19.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$ et pour de la phalloïdine et de la cofiline $L_p = 16.2 \pm 1.4 \mu\text{m}$ (fig 4.11.B).

Malgré un certain nombre de tentatives, nous n'avons cependant pas pu mesurer de manière satisfaisante la longueur de persistance des filaments dans les conditions d'un gel toujours en croissance ($[\text{act}]/[\text{cof}]=1$), car les filaments étaient systématiquement trop courts. Nous nous sommes donc servis de la valeur de McCullough et al. (2008) comme borne inférieure et de celle Isambert et al. (1995) comme borne supérieure. Nous pouvons

donc conclure que dans le cas des gels non stabilisés, la longueur de persistance des filaments est comprise entre 2.2 et 9 μm .

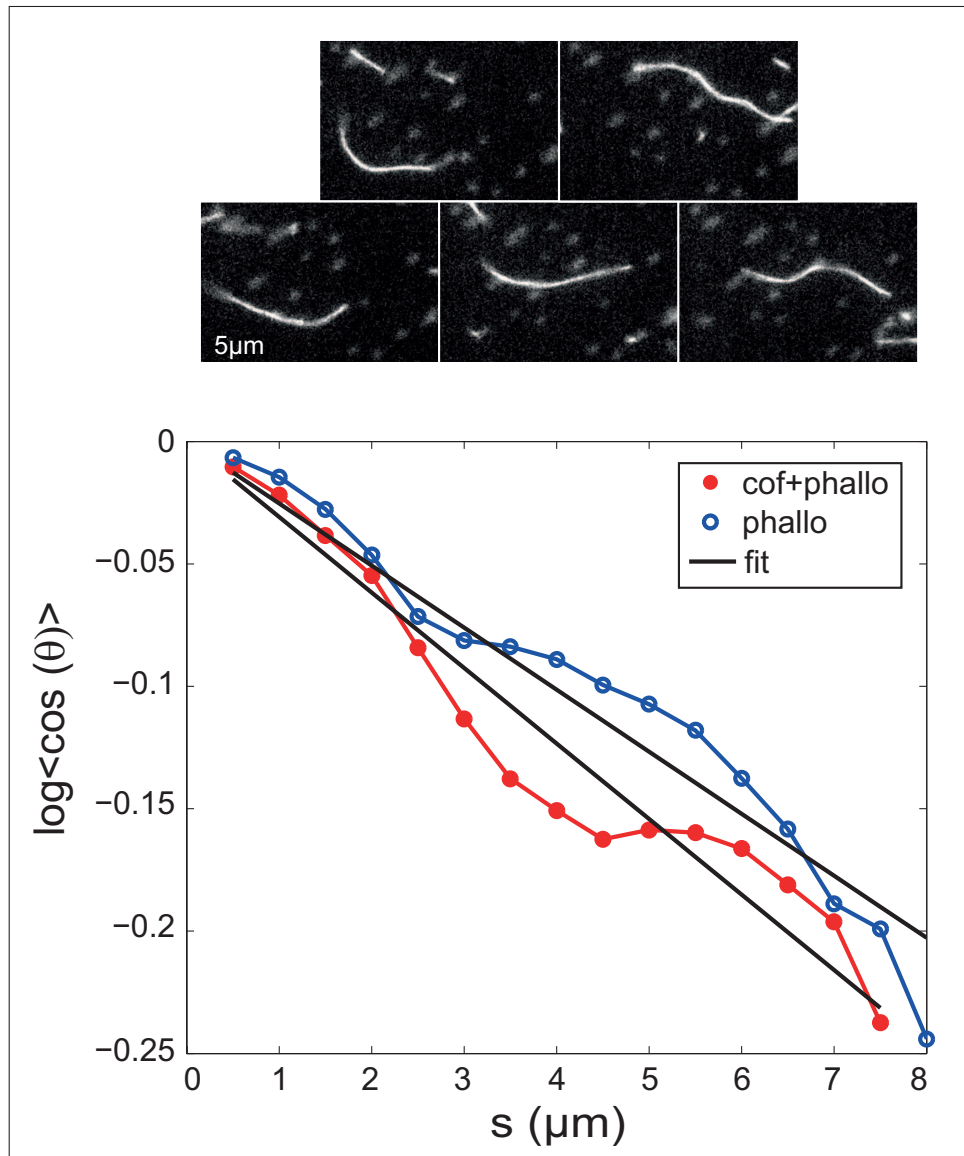


FIGURE 4.11 – Haut, image d'un filament confiné en 2D ; Bas, corrélation d'angle en fonction de l'abscisse curviligne

Pour résumer, la phalloïdine augmente d'un facteur 2 la rigidité du gel et augmente d'un facteur 2 à 9 la longueur de persistance des filaments, la dépendance du module de Young à la longueur de persistance est donc linéaire ou moindre. Bien sûr, le fait que notre relation L_p - E ne comporte que deux points limite notre conclusion. L'idée de lier la réponse macroscopique du gel aux propriétés mécaniques des filaments présente des perspectives très intéressantes si on modifie encore différemment la longueur de persistance des filaments en polymérisant les filaments en présence d'ion BeF^{3-} par exemple.

4.2.2 Rôle de l'architecture

Nous avons vu au chapitre 2 que les différents modèles mécaniques accordent une place centrale aux paramètres décrivant l'architecture du réseau tels que la longueur caractéristique entre deux points d'interaction ou la connectivité du réseau.

Au cours de ma thèse, notre approche expérimentale a été de mesurer les variations du module de Young des gels lorsque l'on fait varier la concentration en Arp2/3 et en gelsoline pendant la croissance. Arp2/3 contrôlant la distance entre les branches et gelsoline la taille des filaments, ces protéines affectent l'architecture du réseau de manière indirecte.

Les milieux reconstitués étant un système très sensible, l'obtention de mesures fiables a nécessité de reproduire chaque concentration indépendamment au moins trois fois avec des lots de protéines différents. Ces mesures représentent la part la plus importante de mon travail de thèse, dans les graphiques qui suivent, chaque point représente entre 200 et 400 valeurs. Les moyennes et les incertitudes de chaque condition présentées ci-dessous prennent en compte à la fois l'écart type d'un échantillon représentant l'incertitude entre les gels polymérisés simultanément, et l'incertitude entre les échantillons liées aux mélanges de protéines et à leur qualité.

La masse de données étant très importante, nous avons eu recours à des méthodes statistiques adaptées dans le cas de systèmes présentant une grande variabilité comme les gels d'actine. La combinaison de l'incertitude intra- et inter-échantillons a été réalisée avec une méta-analyse des données appelée "random effects model", en français le modèle des effets aléatoires. Cette analyse statistique a été développée pour les études de cohorte en médecine qui nécessitent de prendre en compte la fiabilité d'un échantillon. Typiquement, si l'écart type d'un échantillon est plus important que les autres, son poids dans le calcul de la moyenne et de l'erreur standard d'un répliquat sera moindre (Meta-Analysis Fixed effect vs. random effects. Michael Borenstein. 2007). Dans les graphiques ci-dessous, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% (deux fois l'erreur standard) de la valeur moyenne.

Effet d' Arp2/3

Nous avons réalisé des mesures aux concentrations suivantes : [10, 20, 44, 100, 180, 400] nM en Arp2/3 en conservant la gelsoline à 90 nM. Notons que les gels formés à des concentrations inférieures à cette gamme ont des temps de brisure inférieurs au temps nécessaire pour préparer l'échantillon et n'ont donc pas été étudiés. A 10 nM, le module de Young vaut 0.9 ± 0.2 kPa. Il augmente quasi-linéairement jusqu'à 100 nM où il vaut 7.9 ± 2.8 kPa. Entre 100 et 400 nM le module de Young atteint un plateau situé entre 6 et 8 kPa. Le module de Young et la fluorescence moyenne des triplicats sont donnés en figure 4.12

Étudions séparément les deux régimes :

Régime linéaire

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, quel que soit le régime de déformation (enthalpique ou entropique), les modèles introduisent deux grandeurs : la taille de la maille qui reflète la densité du réseau et une longueur caractéristique du réseau sur laquelle un filament

peut se déformer L_c . Pour comprendre si l'augmentation du module est liée à une modification d'architecture du réseau ou à une variation de densité en actine des gels, nous avons utilisé les mesures de fluorescence décrites en section 3.5.2.

On peut voir sur la figure 4.12.B qu'à 10 nM la fluorescence vaut $[740 \pm 250]$ UA et à 100 nM, elle vaut $[930 \pm 250]$ UA. La variation de fluorescence étant du même ordre que nos barres d'erreur, il nous est impossible de conclure strictement entre une variation faible ou nulle de la densité des gels en actine en fonction de la concentration en Arp2/3. L'estimation haute donne une augmentation d'un facteur deux de la densité lorsque $[\text{Arp2/3}]$ passe de 10 à 100 nM. Le module, lui, varie de presque un facteur 10, la densité ne peut pas du tout expliquer à elle seule l'augmentation de module et on peut donc légitimement lier la variation d'élasticité à une modification des paramètres architecturaux.

Plateau

On voit sur la figure 4.12 que le module de Young atteint un plateau au-delà des 100 nM d'Arp2/3. On peut formuler plusieurs hypothèses quant à l'origine de cette saturation :

- une saturation biochimique : par exemple, tous les activateurs VCA sont occupés en permanence et une plus grande concentration d'Arp2/3 dans la solution n'augmente pas la quantité Arp2/3 activé.
- une saturation mécanique : bien que la distance entre branches diminue avec l'augmentation de la concentration en Arp2/3, cela n'a plus d'effet sur la réponse mécanique du réseau comme c'est le cas dans le modèle enthalpique

Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer l'origine de cette saturation, nous reviendrons sur ce point lors de l'exploration des perspectives de cette thèse.

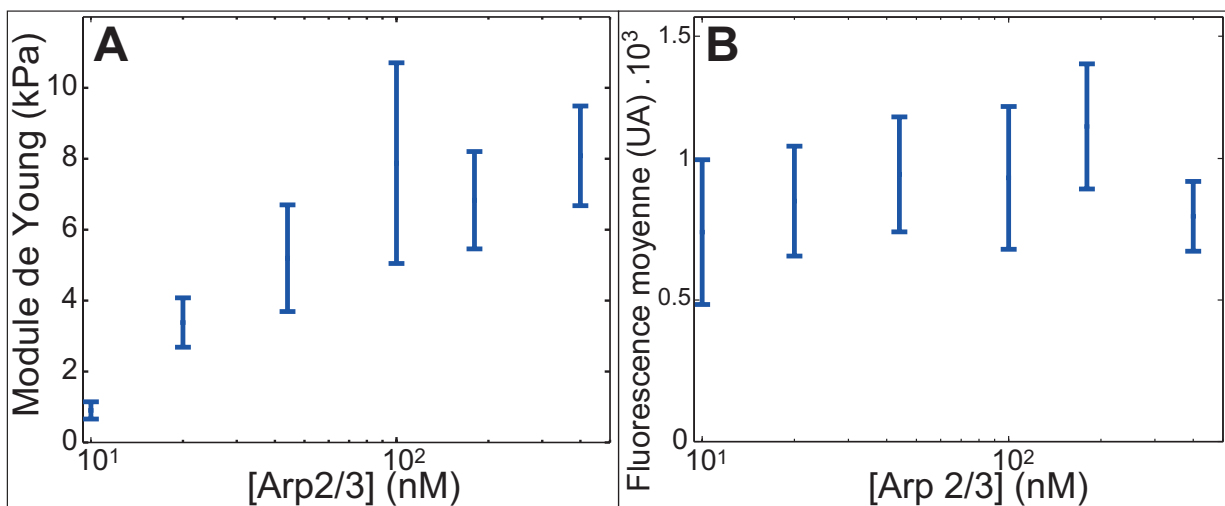


FIGURE 4.12 – A : Evolution du module avec la concentration en Arp2/3, B : Evolution de la fluorescence avec la concentration en Arp2/3

Effet de la gelsoline

L'autre protéine dont nous avons fait varier la concentration est la protéine de coiffe gelsoline. En gardant la concentration en Arp2/3 constante à 180 nM, des mesures ont été réalisées à [20, 50, 90, 150, 250] nM de gelsoline. Les résultats de la fluorescence et du module de Young sont donnés en figure 4.13, le point à 90 nM correspond au point à 180 nM de la figure 4.13.

On peut voir une croissance du module de Young avec la concentration en gelsoline, passant de 2.1 ± 0.1 kPa à 20 nM à 6.8 ± 1.3 kPa à 90 nM. Les barres d'erreur ne nous permettent cependant pas de conclure entre un plateau ou une augmentation plus modérée de la fin de la courbe. A 250 nM de gelsoline le module est de 8.5 ± 1.7 kPa.

L'action de la gelsoline sur les paramètres physiques du réseau n'est pas bien établie. En coiffant les branches en croissance, la protéine réduit la taille moyenne des filaments, ce qui à son tour va avoir de multiples conséquences sur l'architecture du réseau sur lesquelles nous reviendrons dans la section 5.1.1. Nos résultats expérimentaux sont cependant sans équivoque : une augmentation de la concentration en gelsoline rigidifie les gels d'actine. Comme pour la courbe d'Arp 2/3, les mesures de fluorescence n'indiquent pas de variation forte de densité. Encore une fois les barres d'erreur ne permettent pas de trancher entre une densité constante et une faible variation de densité.

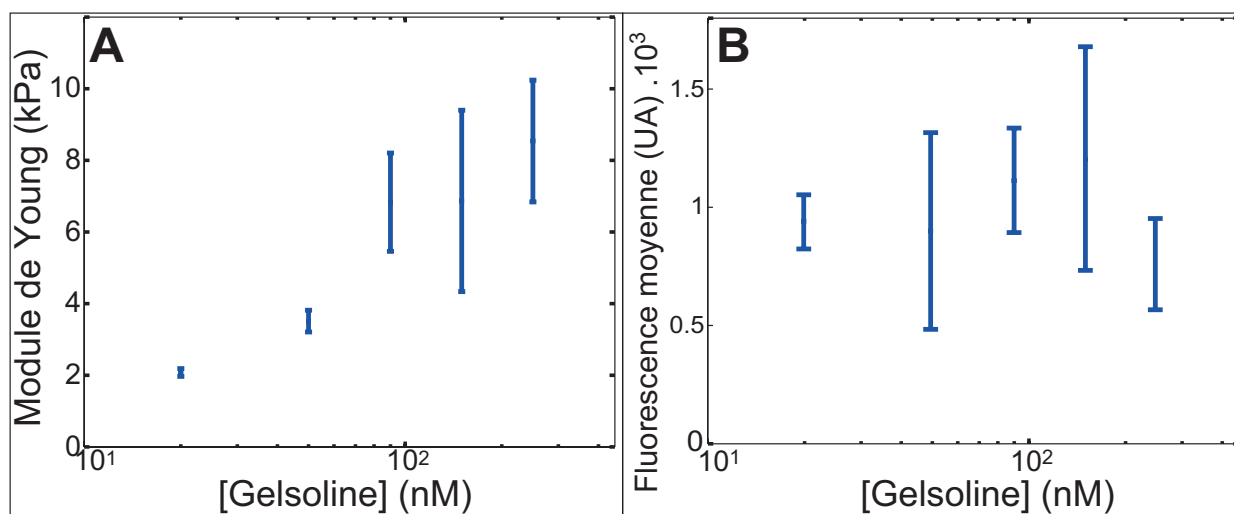


FIGURE 4.13 – A : Evolution du module avec la concentration en gelsoline, B : Evolution de la fluorescence avec la concentration en gelsoline

4.3 Propriétés non linéaires

Un matériau non linéaire voit ses propriétés élastiques évoluer avec la contrainte. Nous avons vu que les gels d'actine polymérisés en solution et les gels denses présentaient des propriétés non linéaires remarquables, permettant une compréhension des mécanismes microscopiques de déformation. Gardel et al. (2004) attribuent la non linéarité intrinsèque de leur gel (ie : rigidification à petite déformation) à un mécanisme d'origine entropique présent dans le modèle d'élongation entropique. Chaudhuri et al. (2007) attribuent l'assouplissement de leur gel à forte pré-contrainte à un flambage des filaments, mécanisme propre aux déformations d'origine enthalpique.

Classiquement, l'étude des propriétés non linéaires se fait en appliquant une pré-contrainte au matériau à laquelle on superpose une oscillation de faible amplitude. Cette mesure permet le calcul du module différentiel défini comme $K = d\sigma/d\epsilon$ (fig 4.14). Nous n'avons cependant pas pu utiliser cette méthode en raison de la géométrie sphérique de notre système. En effet, à cause du contact sphère-sphère, les gels sont plus contraints au centre du contact que sur les bords. Le module étudié est donc un module moyen mesuré sur une gamme de contrainte.

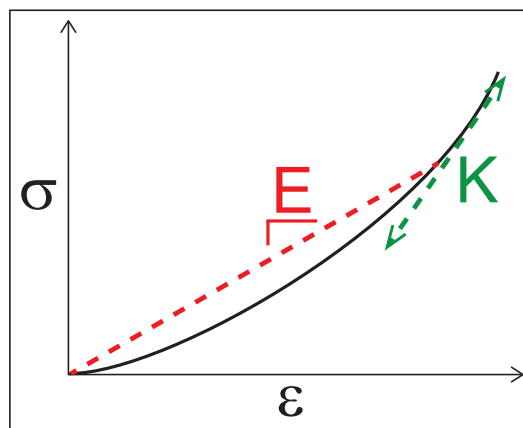


FIGURE 4.14 – Schéma d'une courbe contrainte-déformation d'un matériau non linéaire, le module de Young E est défini par $E = \sigma/\epsilon$ et le module différentiel comme $K = d\sigma/d\epsilon$

N'étant pas en mesure de surmonter les problèmes posés par la géométrie du système dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé deux approches indirectes pour nous intéresser aux propriétés non linéaires de nos gels. D'une part en suivant l'évolution du module des gels avec le temps de croissance et lors de la brisure, et d'autre part en calculant un pseudo module différentiel en fittant par parties les courbes force-distance.

4.3.1 Effet des contraintes internes

L'évolution du module avec le temps de croissance est une mesure indirecte des propriétés non linéaires du gel. En effet, le fait que l'actine polymérise à la surface d'une sphère entraîne l'apparition de contraintes internes dans le gel. Dans certains cas, ces contraintes aboutissent à une brisure du gel. Pour étudier l'impact de l'augmentation et du relâchement des contraintes sur la réponse mécanique de nos gels, nous avons mesuré le module de Young moyen de deux séries de 7 échantillons ayant des temps de croissance allant de

3 à 30 minutes. La première série d'échantillons a été polymérisée à une concentration de 400 nM d'Arp2/3 pour laquelle les gels ne se brisent pas en 30 minutes ; une seconde série à une concentration de 44 nM d'Arp2/3 pour laquelle la majorité des gels est brisée après 15 minutes.

Sur la figure 4.15.A est représentée l'évolution du module de Young en fonction du temps. Pour l'échantillon à 400 nM tous les temps sont représentés, alors que pour l'échantillon à 44 nM, seules les données avant que la brisure dans les gels n'apparaisse sont présentées. Les travaux de Noireaux et al. (2000) présentés en section 3.2 nous permettent d'estimer la contrainte interne moyenne dans l'échantillon à 400 nM puisque nous connaissons à la fois l'épaisseur et le module élastique moyen (fig 4.15.B)

De manière surprenante, on voit qu'expérimentalement le module de Young varie très peu comparé à la variation de la contrainte interne. Alors que cette dernière est multipliée par un facteur 2, le module varie très peu.

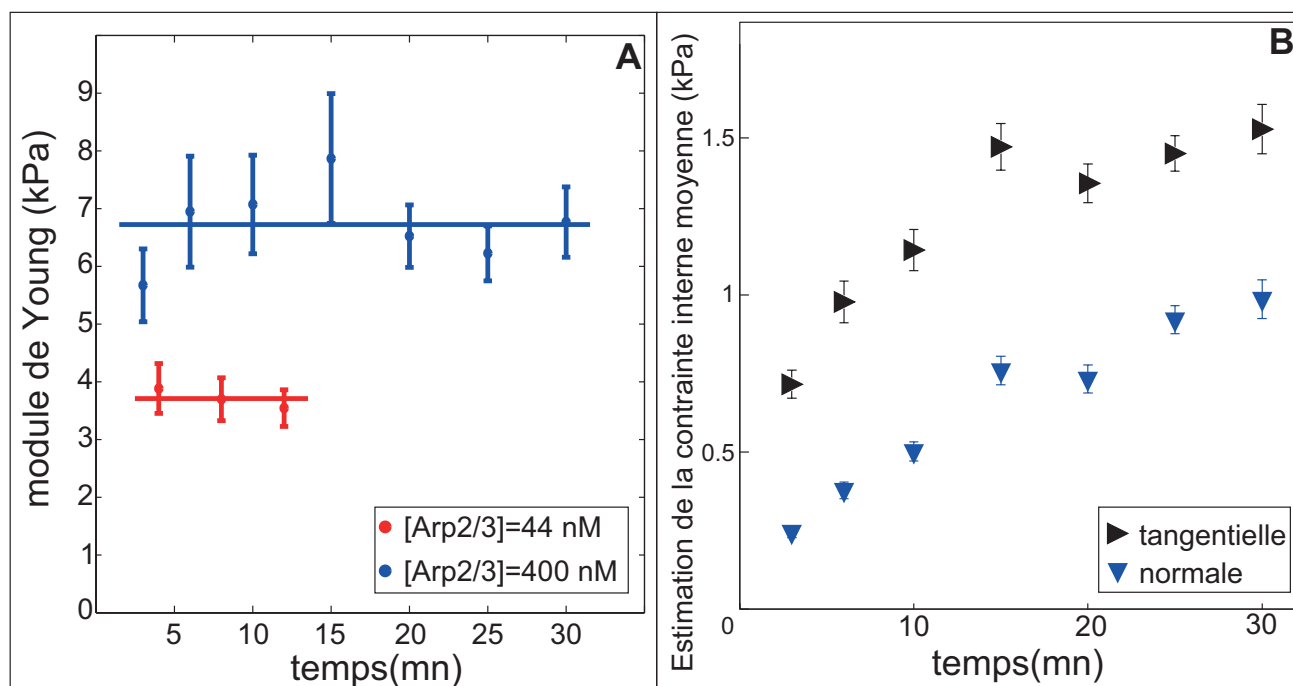


FIGURE 4.15 – A : Evolution du module de Young des gels en fonction du temps pour des concentrations en Arp2/3=44 nM et 400 nM ; B : Estimation de la contrainte interne pour les gels polymérisés à [Arp2/3]=400 nM à partir des mesures d'épaisseur et de module et des calculs de Noireaux et al. (2000)

Contrairement aux gels formés à 400 nM d'Arp2/3, les gels formés en présence de 44 nM d'Arp2/3 vont pour une écrasante majorité se briser au cours de leur croissance. Pour étudier l'impact de cette brisure sur le module de Young, nous avons visuellement classé les gels des différents temps en trois catégories grâce aux images de fluorescence : brisés, non brisés et indéterminés (Fig 4.16.A). En Fig 4.16.B on peut voir l'évolution du pourcentage des deux premières catégories (c'est pour cela que le total n'est pas égal à un). A 10 minutes quasiment aucun gel ne présente de brisure alors que 50% le sont à 18 minutes.

L'impact de cette brisure sur le module est représenté en figure 4.16. En bleu le module des gels non brisés, en rouge celui des gels brisés. On peut voir que lors de la brisure, le relâchement des contraintes conduit à une diminution d'un facteur deux du module élastique. Cette diminution est assez modérée pour un gel présentant une contrainte interne de l'ordre du kPa et relâchant une grande partie de ses contraintes.

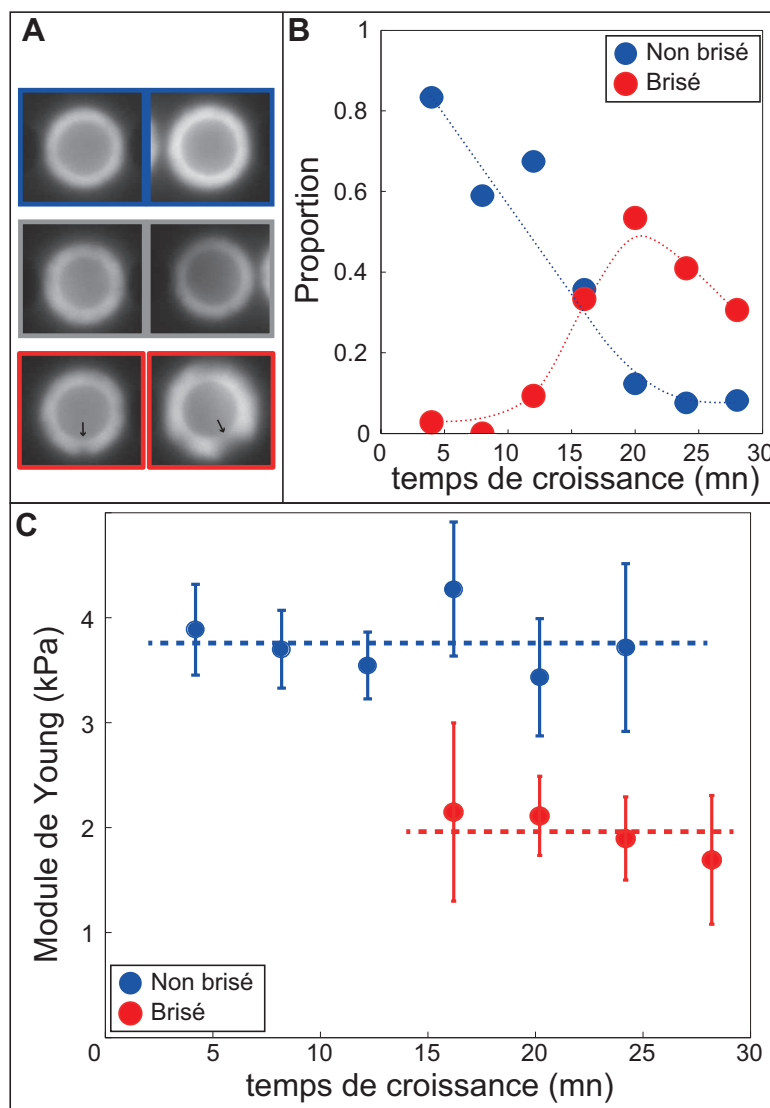


FIGURE 4.16 – A : De haut en bas, exemples de gels non brisés, de gels indéterminés et de gels brisés ; B : Evolution du pourcentage de gels brisés et non brisés ; C : Evolution du module de Young en fonction du temps pour la catégorie brisé et non brisé de l'échantillon $[\text{Arp}2/3]=44 \text{ nM}$

4.3.2 Estimation du module différentiel

La géométrie de notre système expérimental nous empêchant de mesurer le module élastique à des pré-contraintes successives, nous avons recouru au calcul d'un pseudo module différentiel. Même si ce dernier limite notre capacité à conclure rigoureusement sur les propriétés non linéaires de l'actine, il permet d'avoir accès à des mesures qualitatives. Ce pseudo module différentiel est obtenu en fittant nos courbes force-distance sur des pas de force successifs. On inclut les points compris entre [0-15] pN puis, [15-70] pN, [70-150] pN, [150-400] pN, [400-800] pN. Chaque intervalle donne un module et une déformation moyenne tels que $\epsilon = (\delta/R)^2$. (figure4.17)

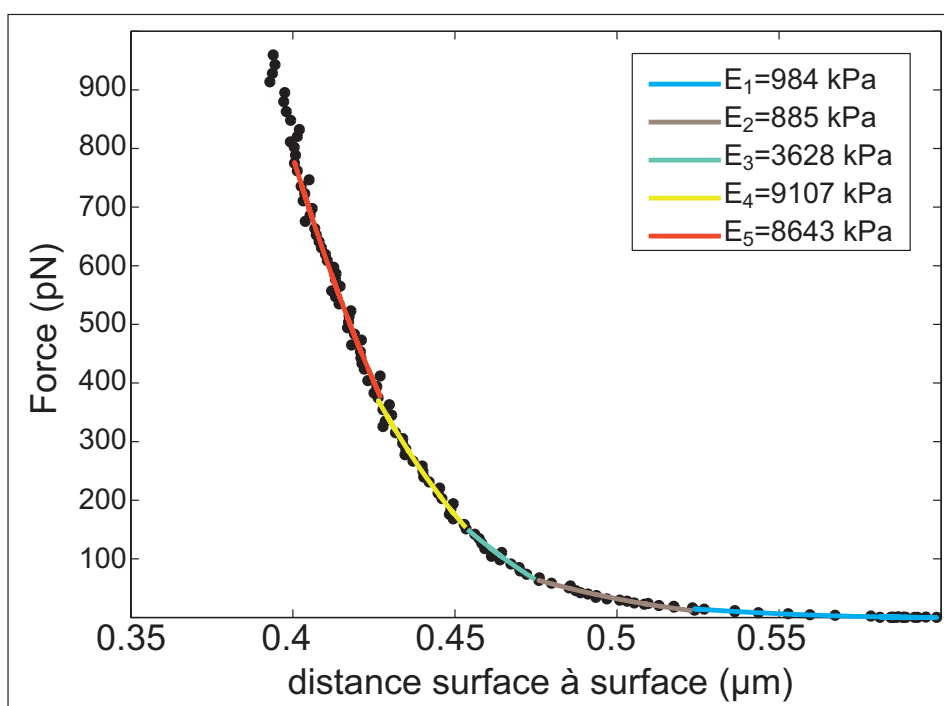


FIGURE 4.17 – Exemple de courbe force-distance de l'échantillon de référence fitté 5 fois sur les intervalles de force : [0, 15, 70, 150, 400, 800]pN

Dans les courbes qui suivent, les points sont le module moyen de chaque condition sur les intervalles de force représentés, en fonction de la déformation homogène équivalente. Cette grandeur représente la déformation équivalente à laquelle il faudrait nous placer pour observer le même comportement mécanique dans un essai de compression uniaxiale produisant une déformation homogène ($\epsilon^* = 0.2\epsilon$ (Lin et al., 2009)). La figure 4.18 concerne les gels polymérisés en présence d'une concentration croissante en Arp2/3 et la figure 4.19 d'une concentration croissante en gelsoline. Dans ces deux figures, celle du haut donne les valeurs du module brut et celle du bas les valeurs du module normalisé par les rigidités individuelles des gels mesurées jusqu'à 500 pN.

Ces courbes montrent des comportements non-linéaires assez semblables (sauf pour les gels les plus mous à [Arp]= 10 nM ou [Gs]= 20 nM). Les modules normalisés montrent une augmentation très similaire mais légèrement décalée en déformation (les gels plus durs présentant une non-linéarité à une valeur de déformation plus faible).

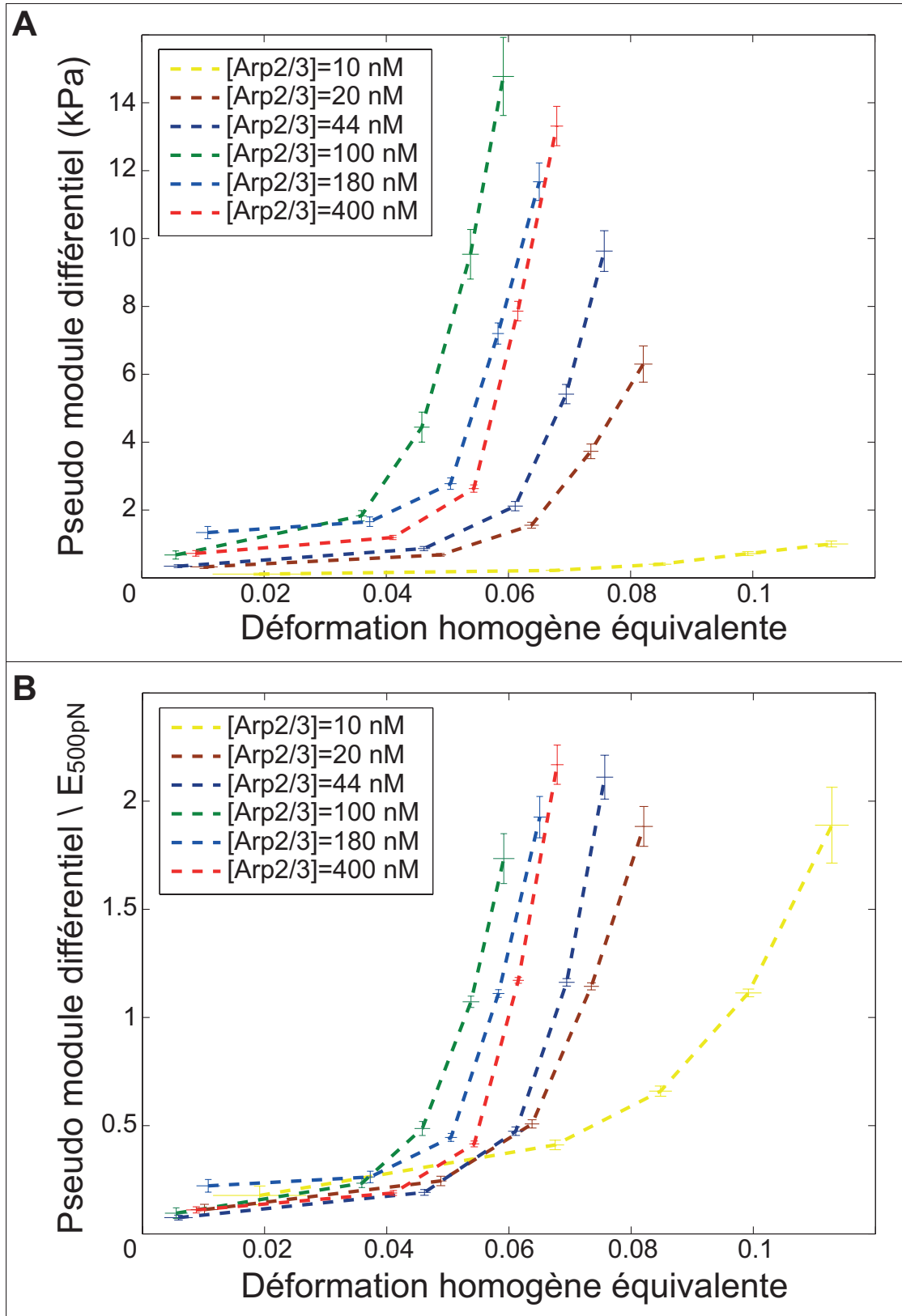


FIGURE 4.18 – A : Moyenne de tous les modules de Young d’une condition biochimique par pas de force en fonction de la déformation homogène équivalente pour des gels polymérisés en présence de 90 nM de gelsoline ; B : Moyenne des modules normalisés par le module à 500 pN ; Les intervalles de force sont [0, 15, 70, 150, 400, 800] pN

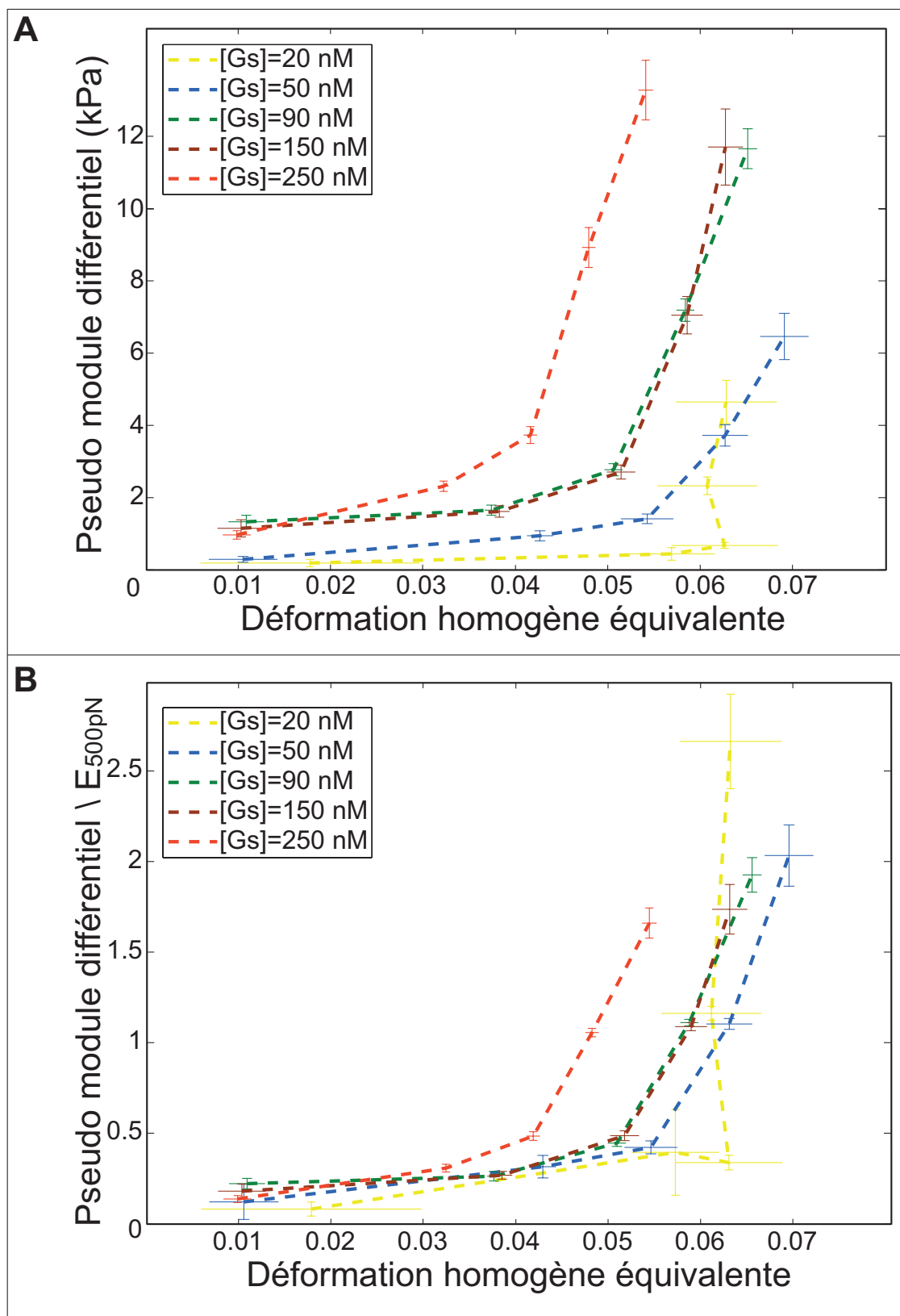


FIGURE 4.19 – A : Moyenne de tous les modules de Young d’une condition biochimique par pas de force en fonction de la déformation homogène équivalente pour des gels polymérisés en présence de 180 nM d’Arp2/3 ; B : Moyenne des modules normalisés par le module à 500 pN ; Les intervalles de force sont [0, 15, 70, 150, 400, 800] pN

Chapitre 5

Discussion et perspectives

5.1 Discussion

Les résultats que nous venons d'examiner constituent la première étude mécanique systématique de gel d'actine polymérisé par la machinerie Arp2/3. Ces gels ont un module de Young de l'ordre 0.5 à 8 kPa pour une concentration en actine de l'ordre de 150 μM . Cette gamme de rigidité et cette concentration correspondant à celles d'une cellule, l'étude de la réponse mécanique de réseaux branchés d'actine est un pas en avant vers une meilleure appréhension des fantastiques propriétés mécaniques des cellules.

Les études des gels polymérisés en solution ont montré que l'origine de la réponse viscoélastique de ces systèmes, qu'ils soient réticulés ou non, peut être attribuée à des effets d'origine entropique. Les gels d'actine formés par la machinerie Arp2/3 étant très différents de ceux reconstitués en solution, notamment du fait de leur forte densité et de leur organisation, nous avons cherché à comprendre comment la polymérisation au contact d'une surface affectait la pertinence des modèles mécaniques.

Le montage expérimental original que nous avons utilisé pour mener cette étude systématique nous a permis de sonder un nombre très important de gels. En effet, l'interaction dipôle-dipôle étant une interaction à courte portée, chaque paire de billes donne accès à une mesure indépendante de module du Young et un échantillon compte typiquement de 20 à 140 mesures. Pour donner un ordre de grandeur, avant cette thèse la littérature sur le sujet relatait seulement l'étude de quelques dizaines de gels, or nous en avons sondé plus de 8000. Ces fortes statistiques sont importantes dans l'étude des systèmes d'origine biologique qui présentent quasiment systématiquement une forte dispersion.

L'accès à un grand nombre de points de mesure nous a permis d'obtenir des incertitudes faibles par rapport aux valeurs moyennes, réalisant ainsi des mesures quantitatives précises. De plus, la possibilité d'utiliser des outils statistiques nous a été très utile lors de la mise au point de l'expérience et de la validation des résultats. On peut citer le test non paramétrique Pearson, qui calcule la corrélation entre différentes grandeurs, ou encore le coefficient de variabilité de dispersion qui permet de comparer des échantillons ayant un type de distribution statistique différent.

La présente thèse étudie des gels d'actine polymérisés à l'aide d'un milieu de protéines purifiées. Ces protéines étant extrêmement fragiles, nous avons réalisé un triplicat de chaque

condition biochimique lors de l'étude la plus importante de nos travaux, à savoir la mesure de la variation du module élastique des gels en fonction de la concentration en Arp2/3 et en gelsoline au cours de leur croissance. Pour prendre en compte à la fois la dispersion des mesures à l'intérieur d'un échantillon et entre échantillons, nous avons eu recours à une meta analyse de données dite "random effect model".

Le principal résultat de cette thèse est la dépendance du module de Young de gels à la concentration de deux ABP, Arp2/3 et gelsoline, lors de sa croissance. On constate une variation quasi linéaire du module de 0.9 kPa à 7.9 kPa lorsque la concentration en Arp2/3 passe de 10 nM à 100 nM suivie d'un plateau situé entre 6 kPa et 8 kPa jusqu'à 400 nM d'Arp2/3. Pour la gelsoline le module passe de 2.1 kPa à 20 nM à 6.8 kPa à 90 nM. Au-delà, les barres d'erreur ne nous permettent pas de conclure entre un plateau et une augmentation plus modérée. A 250 nM de gelsoline, le module est de 8.5 kPa. En parallèle de ces mesures mécaniques, nous avons mesuré une faible variation de fluorescence des gels traduisant une faible variation de la densité d'actine dans les gels. En conclusion, nous mesurons des dépendances du module de Young aux concentrations d'Arp2/3 et de gelsoline trop importantes pour être expliquée par la (faible) variation de la concentration en actine. Nous attribuons ces dépendances à la variation de l'architecture des réseaux. La présente discussion comporte deux parties : l'une s'attache à discuter l'influence des protéines et l'autre à extraire de nos mesures une description microscopique de l'origine de l'élasticité dans des réseaux denses et branchés de polymères semi-flexibles.

5.1.1 Rôle des protéines

En nucléant et en couvrant des filaments, Arp2/3 et gelsoline affectent de nombreux paramètres architecturaux du réseau. Cependant, du fait de leur action simultanée lors de la polymérisation, nombre de ces paramètres sont interdépendants et il est difficile pour l'expérimentateur d'isoler l'impact de chacun sur la réponse mécanique du gel. Nous pouvons cependant discuter de l'effet global des protéines sur la rigidité du réseau.

La littérature nous apprend qu'une augmentation de la concentration en Arp2/3 diminue la distance entre branches (Blanchoin et al., 2000), l'étude de Higgs et al. (1999) montre que ces grandeurs sont inversement proportionnelles sur la gamme de concentration de 0-10 nM. On comprend intuitivement qu'une diminution de la distance entre branches rigidifie le gel. Nos mesures mécaniques indiquent une rigidification nette jusqu'à 100 nM ce qui pourrait indiquer que, au moins jusqu'à cette valeur, l'effet de Arp2/3 sur l'architecture se poursuit dans le même sens.

Au vu de nos résultats, il est difficile de conclure pour les concentrations supérieures à 100nM. En effet, le plateau observé pourrait avoir comme origine une saturation du réseau en Arp2/3 activé lors de la croissance (i.e. une augmentation de la quantité d'Arp2/3 activé n'entraîne plus de diminution de la distance entre les branches) mais pas uniquement. Il pourrait également être lié à une saturation des protéines à la surface des billes (une augmentation d'Arp2/3 n'entraîne alors pas d'augmentation d'Arp2/3 activés) ou une saturation d'origine mécanique sur laquelle nous reviendrons lors de la comparaison de nos résultats aux modèles d'élasticité.

Les conséquences d'une augmentation de la concentration en gelsoline sur l'architecture

du réseau sont difficiles à prédire. En bloquant la croissance des filaments, la gelsoline affecte plusieurs paramètres comme la connectivité moyenne, le degré d'enchevêtrement ou la distance entre branches. Une variation de ces paramètres influence différemment la rigidité des gels, par exemple une diminution de l'enchevêtrement laisse plus de liberté de mouvement aux filaments et conduit donc à un amollissement du gel. A contrario nous avons vu précédemment qu'une diminution de la distance entre branches le rigidifie. Nous reviendrons sur la place de la connectivité moyenne des filaments lors de la comparaison de nos résultats avec les simulations numériques. Expérimentalement, les mesures sont claires : une augmentation de la concentration en gelsoline rigidifie le réseau. Cela laisse entendre que l'effet dominant est probablement une diminution de la distance entre branches. L'idée est la suivante : en présence d'une quantité plus importante de gelsoline, la probabilité que les filaments soient coiffés augmente. On peut donc supposer que si moins de filaments produisent une force, le gel s'écarte globalement moins vite de la surface. Les filaments restant plus longtemps dans la zone où Arp2/3 est activé sans que la distance maximale par rapport au branchement précédent n'augmente avec le temps, cela aboutit à une diminution de la distance moyenne entre branches. Cette vision est notamment en accord avec les observations de Achard et collaborateurs sur l'impact d'une augmentation de la concentration en gelsoline lors de la nucléation d'un réseau dendritique (Achard et al., 2010).

Ces observations sur le lien entre la concentration en Arp2/3 et en gelsoline, et la distance moyenne entre branches peuvent sembler en contradiction avec la faible variation de fluorescence des gels observée simultanément mais cette contradiction n'est qu'apparente. La figure 5.1 en est une illustration : sur les deux schémas, la longueur de filaments est identique, mais on observe une distance entre branches moyenne plus importante sur le schéma de gauche que sur celui de droite. Cet effet est encore plus fort en trois dimensions où les filaments peuvent se croiser sans se toucher.

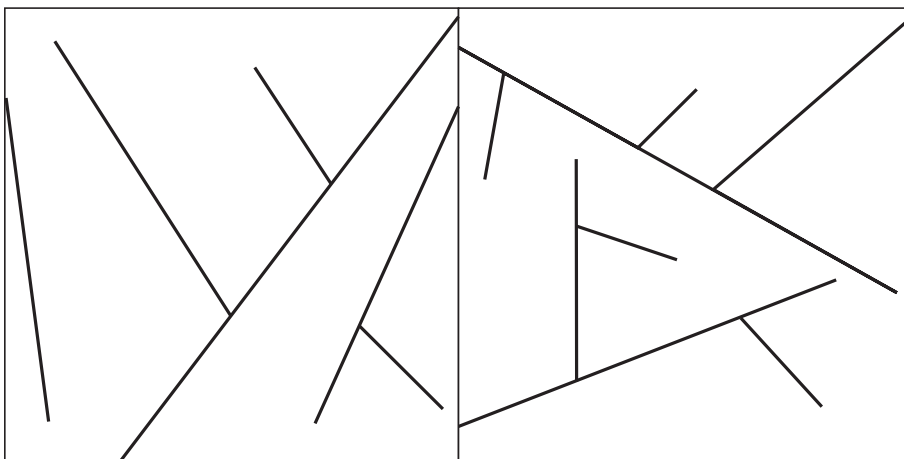


FIGURE 5.1 – Sur les deux schémas la densité surfacique (longueur totale des filaments) est la même, mais la distance entre branches est plus grande à gauche qu'à droite

5.1.2 Origine microscopique de l'élasticité

Plusieurs paramètres entrent dans les lois d'échelle proposées par les différents modèles mécaniques (voir le tableau récapitulatif du chapitre 2). La longueur de persistance (L_p) des filaments, la longueur moyenne de chaîne soumise à la déformation (L_c) et la taille de maille (ξ), que l'on associe à la densité de réseau via la relation ($\xi^2 = ac$).

Tous les modèles de gel réticulé présentent une variation quadratique en fonction de ξ , cette grandeur n'est donc pas d'un grand recours pour comparer nos résultats expérimentaux aux différents modèles théoriques. Les modèles se différencient cependant par leur dépendance à la longueur caractéristique du réseau et à la longueur de persistance des filaments.

Nos mesures mécaniques montrent qu'une augmentation de la concentration en Arp2/3 de 10 à 100 nM entraîne une augmentation d'un facteur dix du module. Dans un réseau dendritique, il semble pertinent d'associer la longueur caractéristique à la distance entre branches. De plus, les résultats expérimentaux de Higgs et al. (1999) indiquent que la distance entre branches est inversement proportionnelle à la concentration en Arp2/3 jusqu'à 20 nM. Au delà, une certaine saturation est observée, mais pourrait être due à la méthode de mesure. Si on extrapole une dépendance linéaire jusqu'à 100 nM, le module de Young d'un gel serait inversement proportionnel à la distance moyenne entre les branches. Cette dépendance ne correspond pas du tout au modèle d'élongation entropique de Mackintosh and Janmey (1995) qui propose une variation de E en L_c^3 et se rapproche plus des modèles enthalpiques qui proposent des dépendances plus faibles avec L_c .

Le résultat de l'étude sur l'impact de la présence de phalloïdine s'interprète également mieux dans le cadre des modèles enthalpiques. En effet, nous avons vu que lorsque la longueur de persistance des filaments passe d'une valeur comprise entre 2 et 9 μm à une valeur de 17 μm , la rigidité du gel n'augmente que d'un facteur deux. Notre dépendance est donc au plus linéaire et pas quadratique comme le prévoit le modèle d'élongation entropique.

Cette idée que les propriétés mécaniques des gels d'actine dendritique sont d'origine enthalpique et non entropique, comme dans le cas des gels polymérisés en solution, s'accorde bien avec l'idée que le rapport L_c/L_p est très différent dans ces deux types de réseaux. En effet pour les gels en solution, L_c/L_p est typiquement de l'ordre de 1. Au vu de la taille de nos gels et de la mesure de densité, les gels que nous avons étudiés ont typiquement un rapport $L_c/L_p \ll 1$. Cela correspond à des filaments dont les fluctuations thermiques de flexion sont très fortement atténuées soit par une rigidité importante, soit par une perte de degré de liberté due à un environnement très contraint.

Selon l'origine enthalpique ou entropique de l'élasticité, le comportement non linéaire d'un matériau présente une signature très différente. L'origine entropique se traduit par une augmentation très forte de la rigidité dès les petites déformations alors que l'origine enthalpique présente une non linéarité moins marquée qui se produit lorsque l'on quitte le domaine des petites déformations. Il aurait donc été intéressant de mesurer directement la variation du module en fonction de la pré-contrainte appliquée à nos gels. Cependant, la géométrie de notre montage expérimental ne nous a pas permis de réaliser cette expérience et ainsi de mesurer le module différentiel. Les mesures indirectes auxquelles nous

avons eu recours pour caractériser les non linéarités de nos réseaux ne permettent pas de faire la différence entre les régimes par l'affirmative. On peut cependant raisonnablement supposer que, si les gels étaient très non linéaires, avec une forte augmentation de leur rigidité dès les petites déformations, une mesure, même indirecte, l'aurait mis en évidence. La faible importance des non linéarités mesurées ici pointe donc elle aussi en direction d'une origine enthalpique de l'élasticité.

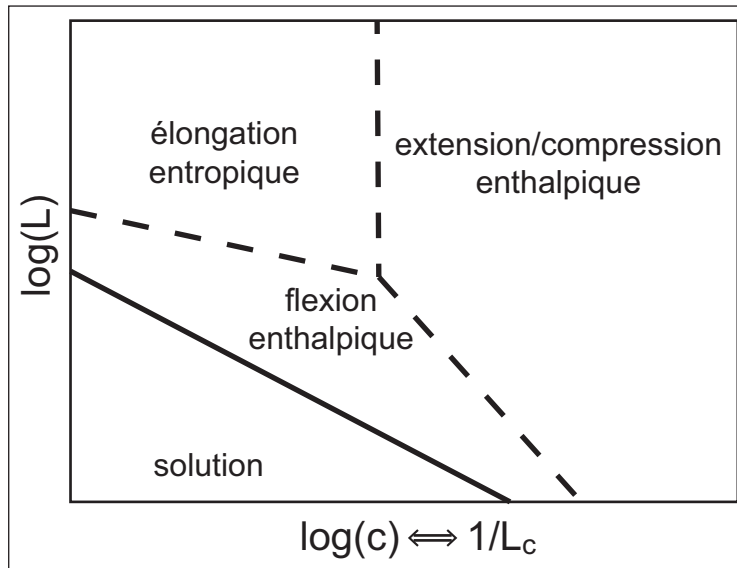


FIGURE 5.2 – Diagramme des modes de déformation d'un réseau d'actine en fonction de la longueur moyenne des filaments (en 2D équivalent à la connectivité) et de la concentration (en 2D équivalente à l'inverse de la densité de réticulation) d'après Head et al. (2003b)

On peut également comparer nos résultats à ceux des simulations numériques de type mikado. Head et al. (2003b) proposent un diagramme de régime comprenant trois modes de déformations : élongation entropique, extension/compression (EC) enthalpique et flexion enthalpique (fig 5.2). Le passage d'un régime à un autre est gouverné par deux paramètres : la longueur moyenne des filaments et la distance entre points de réticulation (ces simulations étant réalisées à deux dimensions, cette grandeur équivaut à $1/c$ avec c la concentration en actine). Qualitativement, les gels polymérisés en solution se trouvent en haut à gauche du diagramme dans la zone entropique puisque les gels en solution sont faits de filaments longs et faiblement réticulés. Qualitativement, on peut placer les gels polymérisés par la machinerie Arp2/3 plus en bas à droite du diagramme puisque les filaments sont nettement plus courts et plus réticulés. On peut en conclure qu'ils se rapprochent de la zone de transition entre le régime de flexion et celui d'élongation/compression, tous deux d'origine enthalpique. Head et al. (2003b) prédisent une transition entre le régime d'extension/compression enthalpique et le régime d'élongation entropique lorsque L_c est de l'ordre de $(a^2 L_p)^{1/3}$ ce qui pour un filament d'actine est de l'ordre de 100 nm. Ceci est bien en accord avec les résultats que nous avons obtenus, avec des gels dont la taille de maille est d'environ 50 nm.

La transition entre les deux régimes enthalpiques a été étudiée numériquement par Broersz et al. (2011). Dans leurs simulations numériques en trois dimensions (fig 5.3), la

transition de régime est gouvernée par deux paramètres. En abscisse le rapport de la rigidité en flexion des filaments sur leur rigidité en EC. Lorsque celui-ci augmente, il devient plus coûteux énergétiquement pour les filaments de fléchir que subir une EC pour accommoder la déformation, ce qui entraîne la transition de régime. En ordonnée se trouve la connectivité : elle représente le nombre moyen de brins qui sont liés à un même nœud. A faible connectivité, la déformation d'un filament n'affecte que peu son environnement immédiat puisqu'il n'est pas connecté à beaucoup d'autres filaments. Pour accommoder la déformation, il est donc moins coûteux au réseau de fléchir fortement une petite partie de ses constituants. C'est pourquoi on parle de déformation non affine pour le mode de flexion. Lorsqu'on augmente la connectivité, le déplacement d'un élément du réseau entraîne la déformation de beaucoup d'autres. Il est donc moins coûteux pour le système de distribuer la déformation sur tous ses constituants en les déformant par EC. Entre les deux régimes, les auteurs décrivent l'existence d'un régime mixte dont la loi d'échelle du module correspond bien à nos mesures expérimentales ($E \sim L_c$).

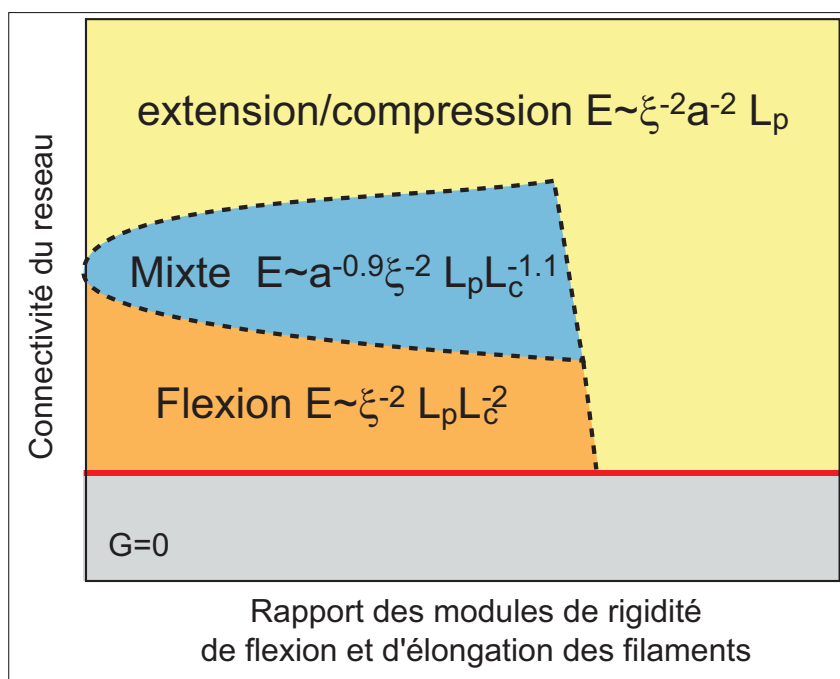


FIGURE 5.3 – Diagramme des modes de déformation d'un réseau d'actine en fonction de la connectivité et du rapport de la rigidité des filaments lorsqu'on les déforme en flexion et en extension/compression. D'après Broedersz et al. (2011)

Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'une augmentation de connectivité, on peut se demander si le plateau observé au delà de 100 nM d'Arp2/3 ne serait pas dû à une transition vers un régime purement EC. En effet on peut s'attendre à ce qu'une diminution de la distance entre branches entraîne une perte de degrés de liberté des filaments, ce qui correspond à l'effet d'une augmentation de la connectivité. Une fois le réseau en régime EC, une diminution de la distance entre branches n'a plus d'effet sur le module puisque la loi d'échelle du régime EC ne dépend pas de L_c , d'où l'apparition d'un plateau. Dans notre système, la connectivité est de 3 puisque la liaison Arp2/3 est en Y. Nous verrons plus loin comment il est possible de faire varier ces quantités pour explorer le diagramme proposé par Broedersz et al. (2011).

5.2 Perspectives

Nous allons maintenant développer quelques perspectives qui s'ouvrent à l'issue de cette thèse. D'une part, celles concernant la suite directe des études que nous avons menées, toujours dans le but de mieux comprendre la réponse mécanique de gel d'actine dendritique et d'autre part, celles offertes par le développement récent d'un nouveau système expérimental également basé sur l'interaction dipolaire magnétique mais utilisant des colloïdes cubiques.

5.2.1 Perspectives directes

Pour approfondir les questions de régime mécanique et de dépendance aux grandeurs caractéristiques et à la connectivité du réseau, il serait intéressant d'ajouter des protéines de réticulation après la polymérisation des gels. Ces liens supplémentaires entre les filaments permettraient de tester les conséquences d'une diminution de la longueur caractéristique du réseau sur le module de Young. Une approche pourrait être de s'interroger sur l'évolution du module d'échantillons initialement faiblement et fortement branchés en fonction de la densité de réticulation ajoutée après la croissance. Si la différence de rigidité entre fort et faible branchement est bien liée à une différence de L_c , on peut s'attendre à ce que l'augmentation de la densité de réticulation mène à une superposition des deux courbes. L'utilisation de protéines de réticulation extérieures à la machinerie Arp2/3 nous permettrait également d'accéder à une gamme plus large de valeurs de L_c .

Une autre question intéressante à aborder pour l'équipe serait celle du débranchement. Durant ma thèse nous avons supposé que le lien réalisé par Arp2/3 entre les filaments était toujours présent dans nos gels et ne se rompait pas avec le temps, notamment du fait que la phalloïdine est connue pour stabiliser le branchement au même titre que le lien entre les monomères d'actine. In vivo, la cinétique de débranchement joue un rôle central dans la transition entre le lamellipode et le lamella. Cette transition se traduit en particulier par la dépolymérisation de certains filaments et une réorganisation en arc de cercle des autres à l'arrière du lamellipode suite à l'action de moteurs moléculaires. Ce mécanisme est proposé pour expliquer la translocation du corps de la cellule (Svitkina et al., 1997).

Récemment, Gandhi et al. (2010) ont montré que la protéine Glia Maturation Factor (GMF) induit un débranchement rapide des filaments. Ils proposent de classer cette protéine dans une nouvelle famille d'ABP dont le rôle serait spécifiquement de réguler le débranchement in vivo. L'ajout de cette protéine à notre système ouvrirait un grand nombre d'axes d'étude. On pourrait notamment étudier la transition de réponse mécanique entre un gel dense réticulé et un gel dense enchevêtré.

L'introduction de protéines de réticulation après la polymérisation et le débranchement permettrait d'aborder des questions relatives à l'influence de la rigidité de la protéine liant les filaments sur la réponse mécanique du réseau. De plus en utilisant plusieurs agents réticulants un nombre différent de filaments nous permettrait de contrôler directement la connectivité du réseau. On peut imaginer mener une étude où l'on suivrait l'évolution du module selon la densité de réticulation par différentes ABP et ainsi tester, au moins

qualitativement, la transition entre différents régimes mécaniques.

L'origine du plateau de rigidité observé à forte concentration d'Arp2/3 pourrait également être éclaircie en menant une étude sur l'impact de la densité de greffage de l'activateur d'Arp2/3 à la surface des billes. Si la saturation de la rigidité du gel au-dessus de 100nM est due à une saturation des activateurs d'Arp2/3, on devrait assister à une modification de la concentration d'Arp2/3 au début de plateau et de la valeur du plateau. Si la saturation est d'origine mécanique (typiquement un changement de régime), le plateau sera identique sur toute une gamme de densité de greffage.

Une étude en fréquence permettrait de mieux comprendre les mécanismes de relaxation des contraintes associées à une déformation. Le comportement en fréquence du G'' nous permettrait d'étudier les temps de relaxation caractéristiques des gels en fonction de la concentration en gelsoline et en Arp2/3. L'expérience de fluage a montré que les gels ont un comportement viscoélastique lorsque la sollicitation est très rapide ($\tau \sim 10\text{ms}$). Il faudra donc sonder les gels à haute fréquence (typiquement 100 Hz) pour obtenir un déphasage sensible entre la contrainte appliquée et la déformation. L'acquisition récente de la caméra Neo de chez Andor nous permettant de monter à des fréquences d'acquisition de 700 Hz devrait rendre ces mesures possible. L'équipe devra cependant s'interroger au préalable sur les problèmes d'adhésion dans un cadre comme celui proposé par la théorie JKR.

Nous avons vu tout au long de ce manuscrit les questions engendrées par la géométrie sphérique du contact. Le fait que dans notre montage expérimental, la surface de contact entre le gel et la sonde dépende de l'indentation, aura été un enjeu récurrent au cours de ma thèse. Le soin apporté au calcul de ce paramètre géométrique est lié à la démarche quantitative que nous avons adoptée. En effet, la connaissance de l'aire de la surface de contact permet d'accéder aux propriétés intrinsèques des gels et ainsi de quantifier les différences en s'affranchissant de variations environnementales. Pour dépasser les limitations imposées par la géométrie de notre contact, un post-doctorant de notre équipe, Joseph Tavacoli, a développé de nouveaux colloïdes magnétiques dont on contrôle la forme très précisément.

5.2.2 Mesures par colloïdes à faces planes

Ces colloïdes sont fabriqués par une technique basée sur la photolithographie. On disperse des particules superparamagnétiques de 300 nm, dont la couche extérieure est faite de silice (MasterBeads, Ademtech), dans de l'ETPTA (Ethoxy TriPropylene TriAcrylate). L'interaction entre les particules de silice et le polymère permet d'atteindre une fraction volumique de particules importante tout en conservant la stabilité et l'homogénéité du mélange. On remplit de cette solution des puits fabriqués par photolithographie dans une plaque de PDMS. Le solvant étant photo-réticulable, les particules nanométriques restent attachées les unes aux autres après avoir été exposées à des rayons UV. Après démoulage, on obtient des colloïdes superparamagnétiques de taille micrométrique de la forme souhaitée.

On peut voir sur les trois premières lignes de la figure 5.4 des images prises en microscopie électronique montrant la diversité des formes accessible. Cette technique est extrêmement puissante pour plusieurs raisons : d'une part la possibilité de contrôler parfaitement la

forme des colloïdes. D'autre part la polydispersité peut être considérée comme étant égale à la précision de gravure dans le masque initial, soit de l'ordre de 5%. Enfin la très forte concentration de la solution initiale en particules nanométriques permet une aimantation à saturation importante des particules micrométriques.

Ce nouveau système permet d'étudier les questions d'auto-organisation à deux dimensions, mais il ne s'agit pas du sujet abordé ici (Tavacoli et al., soumis). Nous allons pour notre part nous intéresser aux nombreuses possibilités d'étude qu'offre la croissance de gel d'actine par la machinerie Arp2/3 sur des particules cubiques. Les avantages offerts par ce nouveau système sont importants, puisque la taille des colloïdes contrôle la taille de la surface de contact qui restera constante pour un gel en croissance et ce quelle que soit l'indentation. Cette nouvelle technique conserve de surcroît l'une des grandes forces du montage expérimental utilisé pendant ma thèse : l'accès à un grand nombre de données expérimentales.

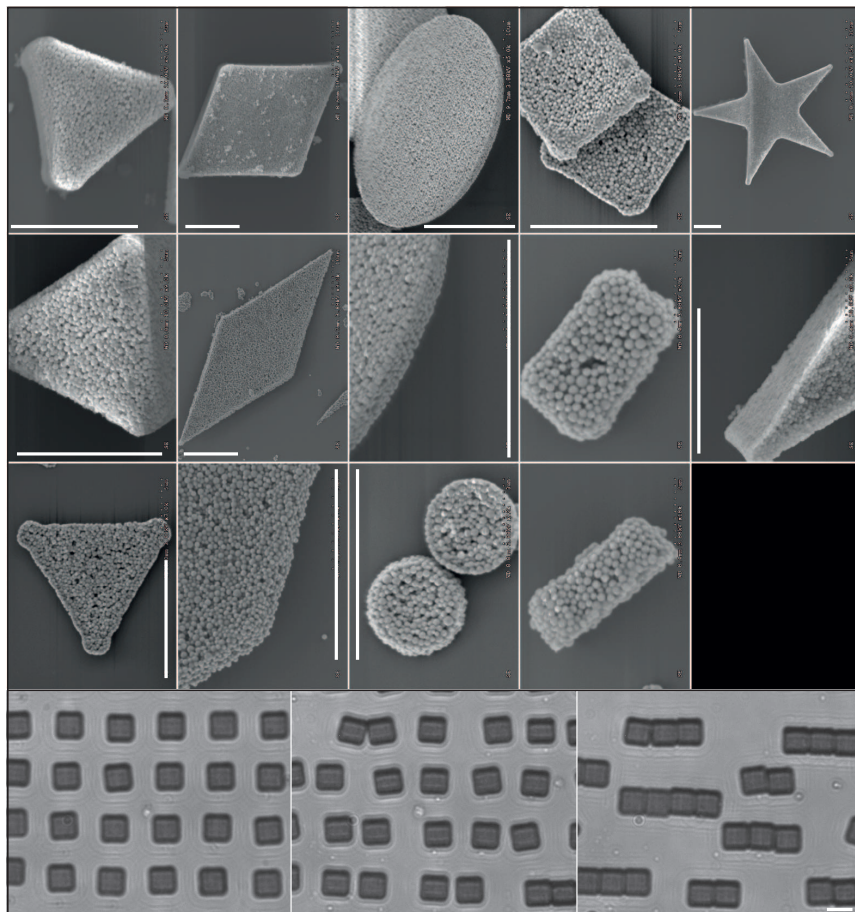


FIGURE 5.4 – Trois lignes du haut : images en microscopie électronique de colloïdes de formes variées ; Ligne du bas : exemple d'auto organisation de colloïdes cubiques lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique, barre d'échelle 10 μm , images de Joseph Tavacoli

Mesure du module différentiel

Une surface de contact plane offre la possibilité d'appliquer une pré-contrainte spatialement constante à l'intérieur des gels. En ajoutant au champ continu une oscillation de petite amplitude, on est capable de mesurer le module différentiel des gels en calculant le rapport entre l'amplitude de la contrainte et celle de la déformation. L'évolution du module différentiel avec la contrainte traduit les propriétés non linéaires du matériau.

Mesure du coefficient de Poisson

En mécanique du solide, la caractérisation complète d'un matériau nécessite la connaissance de deux de ses constantes. Dans le cas des mesures en compression, on s'intéresse en général au module de Young et au coefficient de Poisson du matériau. Bien qu'elle soit souvent négligée dans les études mécaniques dont nous avons parlé, la mesure de ce paramètre permettrait une autre "compréhension" mécanique des réseaux d'actine branchés. Si $\nu = 0.5$, le matériau est incompressible et la perte de volume associée à une compression entraîne l'apparition de contraintes internes importantes liées à une redistribution de la matière dans l'échantillon ; si l'aire de contact est petite devant l'épaisseur du gel, le problème du confinement mène à une erreur importante sur la valeur mesurée du module de Young. A l'opposé se trouvent les matériaux qui ont un $\nu = 0$ et qui sont parfaitement compressibles.

Le contrôle précis de l'aire de la surface de contact offert par la technique de fabrication des colloïdes cubiques nous permettrait de réaliser la première évaluation de ce paramètre pour des réseaux d'actine branchés. En effectuant des mesures mécaniques sur un même échantillon, mais avec des colloïdes cubiques de taille différente, on doit être capable de dire si ces gels sont de type $\nu = 0$ ou $\nu = 0.5$. Si $\nu_{act} = 0$, la valeur du module obtenue sera indépendante de l'aire de la surface de contact, alors que si $\nu_{act} = 0.5$, on s'attend à voir le module de Young du matériau augmenter avec une diminution de l'aire de contact, cette augmentation étant liée à la place de plus en plus importante occupée par les effets de confinement.

Mesure sur des gels non stabilisés

L'étude de gels non stabilisés comporte deux aspects : d'une part les gels en présence d'une forte concentration en monomères, donc en pleine croissance, et d'autre part celle sur des gels en présence d'une concentration en monomères de l'ordre de la concentration critique du bout barbé que l'on peut considérer comme croissant très doucement. Typiquement, le premier cas conduit à l'étude de la vitesse de croissance d'un gel soumis à une contrainte et donc à la mesure de la relation force-vitesse des gels d'actine branchés. Il serait très intéressant de mesurer la variation de cette loi en fonction de la concentration en gelsoline et en Arp2/3, pour voir s'il existe un lien avec leur rigidité mesurée pendant ma thèse. Les mesures sur des gels croissant doucement permettrait notamment d'étudier extensivement la réponse mécanique de gel non stabilisé par de la phalloïdine sans se heurter aux difficultés que nous avons précédemment rencontrées. On pourrait ainsi s'intéresser aux conséquences de la variation de la longueur de persistance des filaments sur le module du matériau à différentes concentrations en Arp2/3 et donc à différents L_c .

Bibliographie

- Abercrombie, M. (1980, February). The Crawling Movement of Metazoan Cells. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* 207(1167), 129–147.
- Abraham, V. C., V. Krishnamurthi, D. L. Taylor, and F. Lanni (1999, September). The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophysical journal* 77(3), 1721–32.
- Achard, V., J.-L. Martiel, Michelot, Alphée, C. Guérin, A.-C. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski (2010, March). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Current biology : CB* 20(5), 423–8.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, R. Keith, and P. Walter (2008). *molecular biology of the cell* (5 ed.). garland science.
- Allioux-Guérin, M., D. Icard-Arcizet, C. Durieux, S. Hénon, F. Gallet, J.-C. Mevel, M.-J. Masse, M. Tramier, and M. Coppey-Moisan (2009, January). Spatiotemporal analysis of cell response to a rigidity gradient : a quantitative study using multiple optical tweezers. *Biophysical journal* 96(1), 238–47.
- Amblard, F., B. Yurke, A. Pargellis, and S. Leibler (1996). A magnetic manipulator for studying local rheology and micromechanical properties of biological systems. *Review of Scientific Instruments* 67(3), 818.
- Balland, M., A. Richert, and F. Gallet (2005, May). The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *European biophysics journal : EBJ* 34(3), 255–61.
- Bausch, A. R. and K. Kroy (2006). A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics*, 231–238.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R. M. Golsteyn, M.-F. Carlier, and C. Sykes (2002, May). The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417(6886), 308–11.
- Birks, J. (1950). The Properties of Ferromagnetic Compounds at Centimetre Wavelengths. *The proceedings of the physical society* 63(362).
- Blanchoin, L., K. J. Amann, H. N. Higgs, J.-b. Marchand, D. A. Kaiser, and T. D. Pollard (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by ARP2/3 complex and WASP / Scar proteins. *Nature* 171(1994), 1007–1011.
- Blanchoin, L. and T. D. Pollard (1998, September). Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *The Journal of biological chemistry* 273(39), 25106–11.

- Blanchoin, L., T. D. Pollard, and R. D. Mullins (2000, October). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Current biology : CB* 10(20), 1273–82.
- Brangbour, C., O. du Roure, E. Helfer, D. Démoulin, A. Mazurier, M. Fermigier, M.-F. Carlier, J. Bibette, and J. Baudry (2011, April). Force-velocity measurements of a few growing actin filaments. *PLoS biology* 9(4), e1000613.
- Broedersz, C. P., X. Mao, T. C. Lubensky, and F. C. MacKintosh (2011, October). Criticality and isostaticity in fibre networks. *Nature Physics* 7(12), 983–988.
- Burtnick, L. D., E. K. Koepf, J. Grimes, E. Y. Jones, D. I. Stuart, P. J. McLaughlin, and R. C. Robinson (1997, August). The crystal structure of plasma gelsolin : implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell* 90(4), 661–70.
- Cameron, L. a., M. J. Footer, A. van Oudenaarden, and J. a. Theriot (1999, April). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9), 4908–13.
- Cameron, L. a., P. a. Giardini, F. S. Soo, and J. a. Theriot (2000, November). Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1(2), 110–9.
- Carlier, M. F. and D. Pantaloni (1997, June). Control of actin dynamics in cell motility. *Journal of molecular biology* 269(4), 459–67.
- Carlsson, a. E. (2003, May). Growth velocities of branched actin networks. *Biophysical journal* 84(5), 2907–18.
- Chaudhuri, O., S. H. Parekh, and D. a. Fletcher (2007, January). Reversible stress softening of actin networks. *Nature* 445(7125), 295–8.
- Chen, P., J. Xiong, and Z. Shen (2008, April). Thickness effect on the contact behavior of a composite laminate indented by a rigid sphere. *Mechanics of Materials* 40(4-5), 183–194.
- Dafalias, Y. F., D. E. Panayotounakos, and Z. Pitouras (2008). Stress field due to elastic mass growth on spherical and cylindrical substrates. *International Journal of Solids and Structures* 45, 4629–4647.
- Dancker, P., I. Low, W. Hasselbach, and T. Wieland (1975). Interaction of actin with phalloidin-polymerization and stabilization of F-actin. *Biochimica et biophysica acta* 400(2), 407–404.
- De Gennes, P., P. Pincus, R. Velasco, and F. Brochard (1976). Remarks on polyelectrolyte conformation. *Journal de Physique* 37(12), 1461–1473.
- de Gennes, P.-G. (1979). *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press.
- De La Cruz, E. M. and T. D. Pollard (1994, December). Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments. *Biochemistry* 33(48), 14387–92.
- Dimitriadis, E. K., F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, and R. S. Chadwick (2002, May). Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophysical journal* 82(5), 2798–810.

- Discher, D. E., P. Janmey, and Y.-L. Wang (2005, November). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)* 310(5751), 1139–43.
- Discher, D. E., D. J. Mooney, and P. W. Zandstra (2009, June). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 324(5935), 1673–7.
- Doi, M. and S. F. Edwards (1988). *The Theory of Polymer Dynamics* (Oxford Uni ed.). Clarendon Press.
- dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. a. Berry, and N. J. Nosworthy (2003, April). Actin binding proteins : regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews* 83(2), 433–73.
- Eggert, U. S., T. J. Mitchison, and C. M. Field (2006, January). Animal cytokinesis : from parts list to mechanisms. *Annual review of biochemistry* 75, 543–66.
- Engler, A. J., M. a. Griffin, S. Sen, C. G. Bönnemann, H. L. Sweeney, and D. E. Discher (2004, September). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness : pathological implications for soft or stiff microenvironments. *The Journal of cell biology* 166(6), 877–87.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher (2006, August). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126(4), 677–89.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002, December). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916), 629–35.
- Fernández, P., P. a. Pullarkat, and A. Ott (2006, May). A master relation defines the nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts. *Biophysical journal* 90(10), 3796–805.
- Fletcher, D. and P. Geissler (2009). Active Biological Materials. *annual review of physical chemistry* 60, 469–486.
- Fletcher, D. a. and R. D. Mullins (2010, January). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463(7280), 485–92.
- Fonnum, G., C. Johansson, A. Molteberg, S. Morup, and E. Aksnes (2005, May). Characterisation of Dynabeads by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1), 41–47.
- Frey, E., K. Kroy, and J. Wilhelm (1999). *Viscoelasticity of biopolymer networks and statistical mechanics of semiflexible polymers*, Volume 5.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003, May). Tumour-cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer* 3(5), 362–74.
- Gandhi, M., B. a. Smith, M. Bovellan, V. Paavilainen, K. Daugherty-Clarke, J. Gelles, P. Lappalainen, and B. L. Goode (2010, May). GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation. *Current biology : CB* 20(9), 861–7.
- Gardel, M., M. Valentine, J. Crocker, A. Bausch, and D. Weitz (2003, October). Micro-rheology of Entangled F-Actin Solutions. *Physical Review Letters* 91(15), 8–11.

- Gardel, M. L., F. Nakamura, J. H. Hartwig, J. C. Crocker, T. P. Stossel, and D. a. Weitz (2006, February). Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(6), 1762–7.
- Gardel, M. L., J. H. Shin, F. C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira, and D. a. Weitz (2004, May). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science (New York, N.Y.)* 304(5675), 1301–5.
- Han, J., L. Han, P. Tiwari, Z. Wen, and J. Q. Zheng (2007, January). Spatial targeting of type II protein kinase A to filopodia mediates the regulation of growth cone guidance by cAMP. *The Journal of cell biology* 176(1), 101–11.
- Hartwig, J. H. and P. Shevlin (1986, September). The architecture of actin filaments and the ultrastructural location of actin-binding protein in the periphery of lung macrophages. *The Journal of cell biology* 103(3), 1007–20.
- Head, D., A. Levine, and F. MacKintosh (2003a, September). Deformation of Cross-Linked Semiflexible Polymer Networks. *Physical Review Letters* 91(10), 2–5.
- Head, D., A. Levine, and F. MacKintosh (2003b, December). Distinct regimes of elastic response and deformation modes of cross-linked cytoskeletal and semiflexible polymer networks. *Physical Review E* 68(6), 1–15.
- Hertz, J. (1881). On the contact of elastic solids. *J. reine angew. Math* 92, 156.
- Heussinger, C. and E. Frey (2006, September). Floppy Modes and Nonaffine Deformations in Random Fiber Networks. *Physical Review Letters* 97(10), 1–4.
- Higgs, H. N., L. Blanchoin, and T. D. Pollard (1999, November). Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* 38(46), 15212–22.
- Hinner, B., M. Tempel, E. Sackmann, K. Kroy, and E. Frey (1998, September). Entanglement, Elasticity, and Viscous Relaxation of Actin Solutions. *Physical Review Letters* 81(12), 2614–2617.
- Isambert, H. and a. C. Maggs (1996, January). Dynamics and Rheology of Actin Solutions. *Macromolecules* 29(3), 1036–1040.
- Isambert, H., P. Vernier, A. Maggs, F. Abdelatif, R. Kassabi, D. Pantaloni, and M.-F. Carlier (1995). flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. *The Journal of biological chemistry*.
- Janmey, P. a. and C. a. McCulloch (2007, January). Cell mechanics : integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annual review of biomedical engineering* 9, 1–34.
- Johnson, K. (1987). *Contact Mechanics*.
- Joly-Duhamel, C., D. Hellio, A. Ajdari, and M. Djabourov (2002). All Gelatin Networks : 2 . The Master Curve for Elasticity. *Langmuir*, 7158–7166.
- Jones, L. J., R. Carballido-López, and J. Errington (2001, March). Control of cell shape in bacteria : helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104(6), 913–22.

- Kabsch, W., H. Mannherz, D. Suck, E. Pai, and K. Holmes (1990). Wolfgang.nature.1990.pdf. *Nature*.
- Keren, K., Z. Pincus, G. M. Allen, E. L. Barnhart, G. Marriott, A. Mogilner, and J. a. Theriot (2008, May). Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* 453(7194), 475–80.
- Kinoshita, M., C. M. Field, M. L. Coughlin, A. F. Straight, and T. J. Mitchison (2002, December). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Developmental cell* 3(6), 791–802.
- Koenderink, G. H., Z. Dogic, F. Nakamura, P. M. Bendix, F. C. MacKintosh, J. H. Hartwig, T. P. Stossel, and D. a. Weitz (2009, September). An active biopolymer network controlled by molecular motors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(36), 15192–7.
- Landau, L. D. and E. M. Lifshitz (1980). *Statistical Physics* (3 ed.).
- Le Clainche, C. and M.-F. Carlier (2008, April). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* 88(2), 489–513.
- leal Calderon, F., T. Stora, O. mondain Monval, P. Poulin, and J. Bibette (2011, January). Direct Measurement of colloidal forces. *Physical Review Letters* 39(4), 604.
- Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization . *infection and immunity* 65(12).
- Lele, T. P., C. K. Thodeti, and D. E. Ingber (2006, April). Force meets chemistry : analysis of mechanochemical conversion in focal adhesions using fluorescence recovery after photobleaching. *Journal of cellular biochemistry* 97(6), 1175–83.
- Lieleg, O., M. Claessens, C. Heussinger, E. Frey, and a. Bausch (2007, August). Mechanics of Bundled Semiflexible Polymer Networks. *Physical Review Letters* 99(8), 3–6.
- Lin, D. C., D. I. Shreiber, E. K. Dimitriadis, and F. Horkay (2009, October). Spherical indentation of soft matter beyond the Hertzian regime : numerical and experimental validation of hyperelastic models. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 8(5), 345–58.
- Liu, A. P., D. L. Richmond, L. Maibaum, S. Pronk, P. L. Geissler, and D. a. Fletcher (2008, August). Membrane-induced bundling of actin filaments. *Nature physics* 4, 789–793.
- Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang (2000, July). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal* 79(1), 144–52.
- Loisel, T. P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M. F. Carlier (1999, October). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401(6753), 613–6.
- Machnicka, B., R. Grochowalska, D. M. BogusÁĆawska, a. F. Sikorski, and M. C. Lecomte (2012, January). Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(2), 191–201.

- Mackintosh, F. C. and P. a. Janmey (1995). Elasticity of semiflexible Biopolymer networks. *Physical Review Letters*.
- Marcy, Y., J. Prost, M.-F. Carlier, and C. Sykes (2004, April). Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(16), 5992–7.
- Mattila, P. K. and P. Lappalainen (2008, June). Filopodia : molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(6), 446–54.
- McCullough, B. R., L. Blanchoin, J.-L. Martiel, and E. M. De la Cruz (2008, September). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments : implications for severing and cell mechanics. *Journal of molecular biology* 381(3), 550–8.
- McCullough, B. R., E. E. Grintsevich, C. K. Chen, H. Kang, A. L. Hutchison, A. Henn, W. Cao, C. Suarez, J.-L. Martiel, L. Blanchoin, E. Reisler, and E. M. De La Cruz (2011, July). Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophysical journal* 101(1), 151–9.
- Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, Mege R-M, and P. Cossart (1996, March). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells. *Cell* 84(6), 923–32.
- Merrifield, C. J., S. E. Moss, C. Ballestrem, B. a. Imhof, G. Giese, I. Wunderlich, and W. Almers (1999, May). Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nature cell biology* 1(1), 72–4.
- Mitrossilis, D., J. Fouchard, A. Guiroy, N. Desprat, N. Rodriguez, B. Fabry, and A. Asnacios (2009, October). Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(43), 18243–8.
- Mitrossilis, D., J. Fouchard, D. Pereira, F. Postic, A. Richert, M. Saint-Jean, and A. Asnacios (2010, September). Real-time single-cell response to stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(38), 16518–23.
- Mizuno, D., C. Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. Mackintosh (2007, January). Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science (New York, N. Y.)* 315(5810), 370–3.
- Mofrad, M. R. (2009, January). Rheology of the Cytoskeleton. *Annual Review of Fluid Mechanics* 41(1), 433–453.
- Mogilner, A. and G. Oster (2003, March). Force generation by actin polymerization II : the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophysical journal* 84(3), 1591–605.
- Mullins, R. D., J. a. Heuser, and T. D. Pollard (1998, May). The interaction of Arp2/3 complex with actin : nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11), 6181–6.
- Noailly, J., H. Van Oosterwyck, W. Wilson, T. M. Quinn, and K. Ito (2008, November). A poroviscoelastic description of fibrin gels. *Journal of biomechanics* 41(15), 3265–9.

- Noireaux, V., R. M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes (2000, March). Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophysical journal* 78(3), 1643–54.
- Odijk, T. (1983). On the Statistics and Dynamics of Confined or Entangled Stiff Polymers. *Macromolecules* (3), 1340–1344.
- Parekh, S. H., O. Chaudhuri, J. a. Theriot, and D. a. Fletcher (2005, December). Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nature cell biology* 7(12), 1219–23.
- Peskin, C., G. Odell, and G. Oster (1993). Cellular Motions and thermal fluctuations : the brownian ratchet. *Biophysical journal* 65(July), 316–324.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003, February). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112(4), 453–65.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, and S. Zigmond (2002). Role of Formins in Actin Assembly : Nucleation and Barbed-End. *Science* 297(5581), 612–615.
- Purdy, K. R., J. R. Bartles, and G. C. L. Wong (2007, February). Structural Polymorphism of the Actin-Espin System : A Prototypical System of Filaments and Linkers in Stereocilia. *Physical Review Letters* 98(5), 1–4.
- Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and a. D. Bershadsky (2001, June). Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology* 153(6), 1175–86.
- Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. a. Kaiser, J. B. Marchand, H. N. Higgs, S. Choe, and T. D. Pollard (2001, November). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science (New York, N. Y.)* 294(5547), 1679–84.
- Sackmann, E., H. P. Duwe, and H. Engelhardt (1986, January). Membrane bending elasticity and its role for shape fluctuations and shape transformations of cells and vesicles. *Faraday discussions of the Chemical Society* 1(81), 281–90.
- Sagot, I., S. K. Klee, and D. Pellman (2002). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nature cell biology* 4(January).
- Satcher, R. L. and C. F. Dewey (1996, July). Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton. *Biophysical journal* 71(1), 109–18.
- Schaub, S., J.-J. Meister, and A. B. Verkhovsky (2007, April). Analysis of actin filament network organization in lamellipodia by comparing experimental and simulated images. *Journal of cell science* 120(Pt 8), 1491–500.
- Schlech, W., P. Lavigne, R. Bortolussi, A. Allen, E. Haldane, A. Wort, A. Hightower, S. Johnson, S. King, E. NICHOLLS, and C. BROOME (1983). Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *New england journal of medicine* 308(4), 203–206.

- Schmidt, F. G., B. Hinner, and E. Sackmann (2000, May). Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on F-actin solutions compared to macrorheometry. *Physical review. E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics* 61(5 Pt B), 5646–53.
- Smythe, E. and K. R. Ayscough (2006, November). Actin regulation in endocytosis. *Journal of cell science* 119(Pt 22), 4589–98.
- Solon, J., I. Levental, K. Sengupta, P. C. Georges, and P. a. Janmey (2007, December). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophysical journal* 93(12), 4453–61.
- Steffen, A., J. Faix, G. P. Resch, J. Linkner, J. Wehland, J. V. Small, K. Rottner, and T. E. B. Stradal (2006). Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2 / 3-Complexes. *molecular biologie of the cell* 17(June), 2581–2591.
- Storm, C., J. Pastore, F. C. MacKintosh, T. Lubensky, and P. Janmey (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435(May), 0–3.
- Stossel, T. P., J. Condeelis, L. Cooley, J. H. Hartwig, a. Noegel, M. Schleicher, and S. S. Shapiro (2001, February). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(2), 138–45.
- Stricker, J., T. Falzone, and M. L. Gardel (2010, January). Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of biomechanics* 43(1), 9–14.
- Suarez, C., J. Roland, R. Boujemaa-Paterski, H. Kang, B. R. McCullough, A.-C. Reymann, C. Guérin, J.-L. Martiel, E. M. De la Cruz, and L. Blanchoin (2011, May). Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Current biology : CB* 21(10), 862–8.
- Sun, H. Q., M. Yamamoto, M. Mejillano, and H. L. Yin (1999). Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein. *The Journal of biological chemistry* 274(3247), 33179–33182.
- Svitkina, T. M. and G. G. Borisy (1999). Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. *Cell* 145(5), 1009–1026.
- Svitkina, T. M., E. a. Bulanova, O. Y. Chaga, D. M. Vignjevic, S.-i. Kojima, J. M. Vasiliev, and G. G. Borisy (2003, February). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of cell biology* 160(3), 409–21.
- Svitkina, T. M., a. B. Verkhovsky, K. M. McQuade, and G. G. Borisy (1997, October). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes : mechanism of cell body translocation. *The Journal of cell biology* 139(2), 397–415.
- Tharmann, R., M. Claessens, and a. Bausch (2007, February). Viscoelasticity of Isotropically Cross-Linked Actin Networks. *Physical Review Letters* 98(8), 8–11.
- Tilney, L. G. and D. a. Portnoy (1989, October). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of cell biology* 109(4 Pt 1), 1597–608.

- Trepats, X., L. Deng, S. S. An, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, W. T. Gerthoffer, J. P. Butler, and J. J. Fredberg (2007, May). Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature* 447(7144), 592–5.
- Tseng, Y., E. Fedorov, J. M. McCaffery, S. C. Almo, and D. Wirtz (2001, July). Micro-mechanics and ultrastructure of actin filament networks crosslinked by human fascin : a comparison with alpha-actinin. *Journal of molecular biology* 310(2), 351–66.
- Ugelstad, J. and P. Mork (1980). Swelling of oligomer polymer particles-New methods of preparation of emulsions and polymer dispersions. *Advances in colloid and interface science* 13(1-2), 101–140.
- Uribe, R. and D. Jay (2009, January). A review of actin binding proteins : new perspectives. *Molecular biology reports* 36(1), 121–5.
- Van der Gucht, J., E. Paluch, J. Plastino, and C. Sykes (2005, May). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(22), 7847–52.
- Verkhovsky, A. and G. G. Borisy (1993). Non-Sarcomeric Mode of Myosin II Organization in the Fibroblast Lamellum. *journal of cell biology* 123(3), 637–652.
- Vogel, V. and M. Sheetz (2006, April). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(4), 265–75.
- Wachsstock, D. H., W. H. Schwartz, and T. D. Pollard (1993, July). Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophysical journal* 65(1), 205–14.
- Wachsstock, D. H., W. H. Schwarz, and T. D. Pollard (1994, March). Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophysical journal* 66(3 Pt 1), 801–9.
- Wang, N., J. P. Butler, D. E. Ingber, and E. Donald (1993). Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton. *Science* 260(5111), 1124–1127.
- Wegner, A. (1976, November). Head to tail polymerization of actin. *Journal of molecular biology* 108(1), 139–50.
- Welch, M. (1997). Actin dynamics in vivo. *Current Opinion in Cell Biology* 9(1), 54–61.
- Welch, M. D. and R. D. Mullins (2002, January). Cellular control of actin nucleation. *Annual review of cell and developmental biology* 18, 247–88.
- Welch, M. D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D. A. Portnoy, and T. J. Mitchison (1998). Interaction of Human Arp2 / 3 Complex and the Listeria monocytogenes ActA Protein in Actin Filament Nucleation. *Science (New York, N.Y.)* 281(5373), 105–109.
- Wiesner, S., E. Helfer, D. Didry, G. Ducouret, F. Lafuma, M.-F. Carlier, and D. Pantaloni (2003, February). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *The Journal of cell biology* 160(3), 387–98.
- Wilhelm, J. and E. Frey (2003, September). Elasticity of Stiff Polymer Networks. *Physical Review Letters* 91(10), 1–4.

- Xu, J., D. Wirtz, and T. D. Pollard (1998, April). Dynamic cross-linking by alpha-actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *The Journal of biological chemistry* 273(16), 9570–6.
- Yuan, H., S. Kononov, F. S. A. Cavalcante, K. R. Lutchen, E. P. Ingenito, B. Suki, and S. A. Francisco (2000). Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. *Journal of Applied Physics* (89), 3–14.
- Zhang, H. and M. Widorn (1995). Field-induced forces in colloidal particle chains. *Physical Review E* 51(3), 2099–2103.

Annexe A

Relation entre les grandeurs mécaniques macroscopiques

	λ, G	E, G	K, λ	K, G	ν, λ	G, ν	E, ν	K, ν	K, E
$K =$	$\lambda + \frac{2G}{3}$	$\frac{EG}{3(3G-E)}$			$\frac{\lambda(1+\nu)}{3\nu}$	$\frac{2G(1+\nu)}{3(1-2\nu)}$	$\frac{E}{3(1-2\nu)}$		
$E =$	$\frac{G(3\lambda+2G)}{\lambda+G}$		$\frac{9K(K-\lambda)}{3K-\lambda}$	$\frac{9KG}{3K+G}$	$\frac{\lambda(1+\nu)(1-2\nu)}{\nu}$	$2G(1+\nu)$		$3K(1-2\nu)$	
$\lambda =$		$\frac{G(E-2G)}{3G-E}$		$K - \frac{2G}{3}$		$\frac{2G\nu}{1-2\nu}$	$\frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)}$	$\frac{3K\nu}{(1+\nu)}$	$\frac{3K(3K-E)}{9K-E}$
$G =$			$\frac{3(K-\lambda)}{2}$		$\frac{\lambda(1-2\nu)}{2\nu}$		$\frac{E}{2(1+\nu)}$	$\frac{3K(1-2\nu)}{2(1+\nu)}$	$\frac{3KE}{9K-E}$
$\nu =$	$\frac{\lambda}{2(\lambda+G)}$	$\frac{E}{2G} - 1$	$\frac{\lambda}{3K-\lambda}$	$\frac{3K-2G}{2(3K+G)}$					$\frac{3K-E}{6K}$

FIGURE A.1 – K le module de compressibilité ; E le module de Young ; λ le premier coefficient le Lamé ; G le module de cisaillement ; ν le coefficient de Poisson

Annexe B

Concentration des tampons

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

Annexe C

Mesure de l'épaisseur

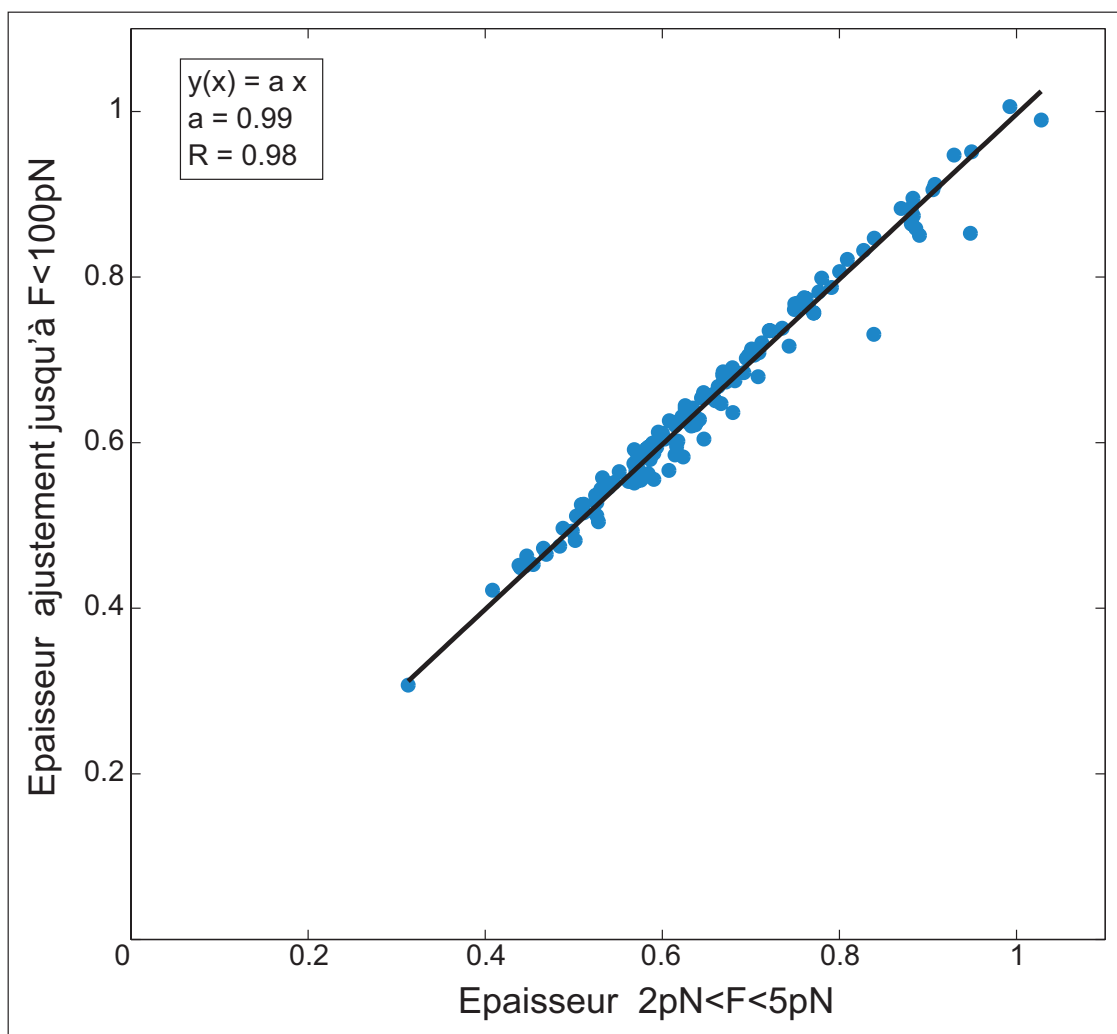


FIGURE C.1 – Comparaison des méthodes de mesure de l'épaisseur ; en ordonnée l'épaisseur des gels obtenue par un ajustement des points de la courbe force-déplacement inférieurs à 100 pN par le modèle de Hertz ; en abscisse l'épaisseur obtenue en faisant la moyenne de la distance des points compris entre 2 pN et 5 pN

Annexe D

Publication

PNAS PNAS PNAS PNAS

Impact of branching on the elasticity of actin networks

Thomas Pujol, Olivia du Roure¹, Marc Fermigier, and Julien Heuvringh

Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes, École Supérieure de Physique et Chimie Industrielle de la ville de Paris, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7636, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris Diderot, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

Edited by David A. Weitz, Harvard University, Cambridge, MA, and approved May 22, 2012 (received for review December 23, 2011)

Actin filaments play a fundamental role in cell mechanics: assembled into networks by a large number of partners, they ensure cell integrity, deformability, and migration. Here we focus on the mechanics of the dense branched network found at the leading edge of a crawling cell. We develop a new technique based on the dipolar attraction between magnetic colloids to measure mechanical properties of branched actin gels assembled around the colloids. This technique allows us to probe a large number of gels and, through the study of different networks, to access fundamental relationships between their microscopic structure and their mechanical properties. We show that the architecture does regulate the elasticity of the network: increasing both capping and branching concentrations strongly stiffens the networks. These effects occur at protein concentrations that can be regulated by the cell. In addition, the dependence of the elastic modulus on the filaments' flexibility and on increasing internal stress has been studied. Our overall results point toward an elastic regime dominated by enthalpic rather than entropic deformations. This result strongly differs from the elasticity of diluted cross-linked actin networks and can be explained by the dense dendritic structure of lamellipodium-like networks.

cytoskeleton | dendritic networks | magnetic dipolar forces | enthalpic elasticity | semiflexible polymer

The cytoskeleton is an interconnected network of filamentous polymers and regulatory proteins. The cell's integrity, deformability, and capacity to change shape come from the mechanical properties of these organized assemblies of filaments. Both the flexibility of the filaments themselves and their relative organization give the assembly its mechanical properties. We are interested in unraveling the link between mechanical properties and microscopic architecture in actin cytoskeleton networks. In cells, the actin filaments are organized by a large variety of proteins into different types of structures, depending on their location in the cell and their function (1). For example, in cell motility, actin polymerization drives protrusion of the leading edge of a crawling cell (2) within two organelles, lamellipodia and filopodia, based on two different actin polymerization machineries (3, 4). In lamellipodia, which are broad, flat protrusions, actin filaments assemble into a dendritic network through the branching protein complex Arp2/3 (4, 5). The polymerization of actin filaments at their barbed ends generates the driving force that extends the cell membrane forward. In filopodia, which are long finger-like protrusions filled with bundled actin filaments, processive actin barbed-end assembly is induced by formins at the tip (6). Actin is also present in the cortex, a cross-linked structure found beneath the plasma membrane, where it ensures cell integrity and mechanical support. These actin meshworks predominantly contribute to the cell's ability to sense the micromechanical environment properties and to transmit compressive and tensile stresses. Their mechanical properties are crucial to determine the distance over which cellular response can be triggered by mechanical cues (7).

Polymer networks have elastic properties that directly rely on the individual behavior of their polymer chains and their relative

organization. Actin filaments are semiflexible polymers: in all networks found in the cell, their typical length is less or comparable to their persistence length, i.e., they do not form loops and are nearly straight. As a consequence, the elasticity of their networks arises from two contributions: an entropic one that originates in the thermal fluctuations of individual filaments and an enthalpic one that comes from mechanical deformations of the filaments themselves (Fig. 1A). In entropic elasticity, filaments resist extension by the decrease in the number of available configurations. Near full extension, as the available conformations are drastically reduced, the filaments resist strongly to further extension. This phenomenon appears even at small strains in networks formed from semiflexible polymers, as they are already close to extension. Networks formed from such polymer stiffen when subjected to increasing stress, a behavior called nonlinear elasticity, typical of biological networks (8). Cross-linked actin networks exhibit this kind of entropic elasticity with a strong stress-stiffening (9, 10). Enthalpic elasticity comes from the mechanical deformation of the molecular links between monomers within the filament. Two regimes of enthalpic elasticity have been identified, one dominated by filament bending, the other by compression or stretching of the filaments (11–13). In enthalpic elasticities, the above-mentioned mechanism responsible for stress stiffening is absent. However, the enthalpic buckling of filaments subjected to an important force can lead to stress-softening, as was observed in dense branched networks (1).

Here we present a new technique that allows the collection of large amounts of data on the mechanical properties of actin networks. We study actin organized in structures comparable to the lamellipodium. The actin network is directly assembled in dendritic gels around superparamagnetic colloids, and mechanical measurements are based on magnetic dipolar attraction between colloids. The network growth occurs from the surface of the colloids and requires a limited number of proteins including actin, the Arp2/3 complex and a capping protein (14, 15). Due to this assembly process, we can probe denser and more organized actin networks than those that have been measured by macro- or micro-rheology. Previous experiments based on these techniques have used purified actin filaments either entangled or cross-linked by various proteins, forming loose networks (16). Measurements have been performed on branched actin networks grown from a surface via the Arp2/3 complex, as in our experiments (17, 18). These experiments are delicate, as they use macroscopic force sensor such as AFM and micropipette, which prevents the authors from studying a large range of parameters. On the contrary, in our experiment, each pair of colloids is a measurement device by itself, which allows us to carry out orders of

Author contributions: O.d.R., M.F., and J.H. designed research; T.P., O.d.R., and J.H. performed research; T.P., O.d.R., and J.H. contributed new reagents/analytic tools; O.d.R., and J.H. analyzed data; and T.P., O.d.R., and J.H. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. Email: olivia.durore@espci.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1121238109/-DC3Supplemental.

BIPHYSICS AND
COMPUTATIONAL BIOLOGY

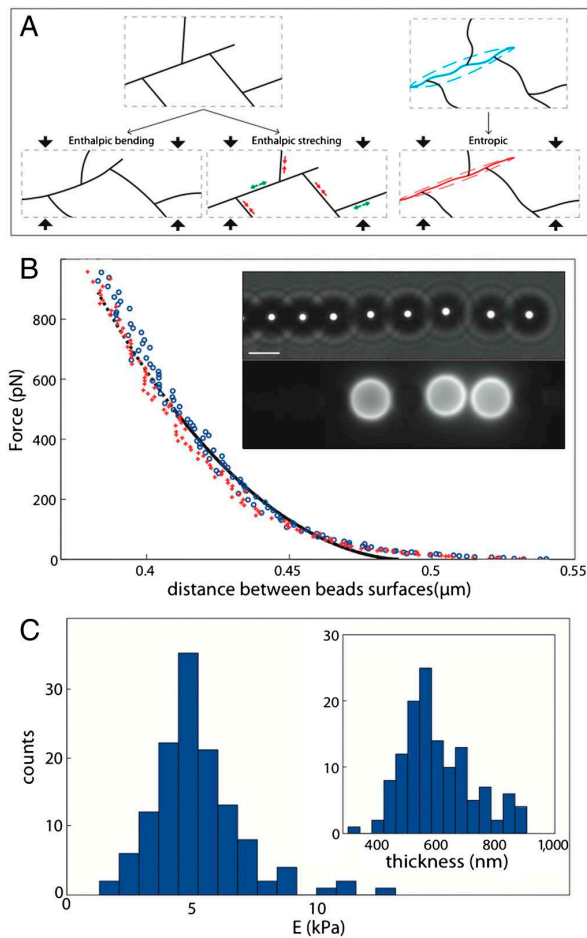


Fig. 1. Modes of deformation and principle of measurements. (A) Schematic of enthalpic (Left) and entropic (Right) deformations of Arp2/3 branched filaments. The deformation of the box is vertical and the material is considered incompressible. (B) Typical force-distance curve. Blue circle: compression; red crosses: decompression; black lines: Hertzian fit modified for finite thickness (plain: range of the fit; dotted: extrapolation to the whole range of distance). Inset: bright-field and fluorescent images of a chain. Three beads are covered by actin gel as shown by the fluorescent image. Scale bar, 4 μm . (C) Histogram of Young's moduli extracted from one experiment (129 probed gels) at $[\text{gelsolin}] = 90 \text{ nM}$ and $[\text{Arp2/3}] = 180 \text{ nM}$. Mean value is 5.2 kPa; standard deviation is 1.9 kPa. Inset: Histogram of thicknesses; mean value is 650 nm; standard deviation is 130 nm.

magnitude more measurements than those allowed previously. We have thus studied the mechanical properties of gels with different histories and architectures by tuning the growth conditions. Using reconstituted medium allows us to modify the growth concentration of two proteins crucial for the architecture of the network: Arp2/3 complex, which induces the formation of new branches, and gelsolin, which regulates the length of filaments by capping the growing end. Hence we aim to establish the relationship between the growth process, the architecture, and the mechanics of actin networks.

Results

In this work, dendritic gels of actin grow around superparamagnetic colloids. We use a minimal set of proteins (14, 15): F-actin, gelsolin, Arp2/3 complex and cofilin, and colloids covered with the VCA domain of the protein neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein (N-WASP). The polymerization is localized at the

surface of magnetic beads. The formation and the integrity of the gel are checked by fluorescence microscopy using labeled actin. Specifically we let the gel grow for 15 min before stopping the polymerization by dilution in a buffer containing phalloidin. We thus obtain a stable configuration in which actin filaments do not polymerize (due to dilution, the actin concentration becomes smaller than the critical concentration for polymerization) and do not depolymerize (due to the stabilization of the filaments by phalloidin). These gels are stable for at least one hour. No evolution of the gels thickness or fluorescence was observed during the time course of an experiment. The mean fluorescence in the shell is measured for each actin gel, and gives an estimation of the actin concentration in the networks of the order of 170 μM (*Materials and Methods*).

Under a uniform magnetic field, each colloid acquires a magnetic moment that depends on the magnetic field intensity, and the only force applied to the colloids arises from dipolar interaction between neighboring beads. As a consequence, the colloids self-organize in chains parallel to the field and do not migrate (Fig. 1B). The dipolar forces between colloids in chains have already been used successfully to measure colloidal forces (19) and actin-polymerization induced forces (20). Increasing the magnetic field increases the attractive dipolar force between the colloids (21) and induces deformation of the gels present on the colloids. The relative displacement of the beads is measured by video microscopy as a function of field strength, and a force-distance profile is reconstructed from these measurements (Fig. 1B). The main advantage of this technique is that each pair of beads is a sensor by itself and tens of force-distance curves can thus be recorded within half an hour in one sample.

To provide a well-defined surface of contact during the deformation of the actin shells, we mix actin-covered beads with non-adhesive bare beads (BSA-coated) and only consider actin gels facing bare beads (see *SI Text* and Fig. S1 for a typical experiment between two actin-covered beads). As the surface of the gel is spherical, the area in contact with the neighboring bead increases when the gel is deformed. This situation is a typical problem of contact mechanics described by the Hertz contact theory. The experimental force-distance curves are fitted by a modified Hertzian model that takes into account the finite thickness of the elastic medium (22). Both the elastic modulus and the thickness of the gel are used as adjustable parameters.

A typical force-distance curve showing the deformation of an actin gel is given in Fig. 1B. The difference between the loading (compression) and unloading (decompression) curves is minimal. The fit is in good agreement with the experimental curves, except for the largest distances between colloids (*SI Text*). Fig. 1C shows the histogram of elastic modulus obtained from 129 different actin gels grown at our reference concentrations of proteins (180 nM Arp2/3 and 90 nM gelsolin). The mean value of the elastic modulus is 5.2 kPa and has a standard deviation of only 1.9 kPa. Thanks to the large number of measurements in one sample (between 50 and 150 gels are probed in one experiment), the confidence interval at 95% for the mean elastic modulus is 10% of the mean. Reproduction of the same experimental conditions introduces new uncertainties, and the standard deviation between the mean elastic modulus of different experiments is on the order of 20%, which is still much lower than published values on comparable branched actin networks.

Our measurements are in good agreement with values provided by Chaudhuri et al. and Marcy et al. on dendritic actin gels grown from a surface with the same Arp2/3 machinery (17, 18), but differ strongly from measurements on cross-linked networks. This discrepancy can be explained by stronger actin concentration (23) and the different architectures of the networks. Our measurements are also compatible with the values measured in single cells and in tissues. Typical Young's moduli range from 650 Pa

for liver to tens of kPa for muscle (7). On single cells in culture, typical values scatter between 0.1 and 40 kPa (24).

Elasticity and Architecture. As the architecture of the gels is tightly linked to the growth process, varying the concentration of the branching and capping proteins in the polymerization medium changes the architecture of the studied networks. We carry out measurements in which the concentration of one protein is varied while all the others are kept constant. At constant gelsolin (90 nM) we investigate a range of Arp2/3 concentrations from 10 nM to 400 nM. Note that lower values induce formation of fractured gels. Likewise, at constant Arp2/3 (180 nM), we investigate a range of gelsolin concentrations from 20 nM to 250 nM. In this case, lower values induce formation of gels that are too thin to be probed. Each point is reproduced at least three times for a total of 200–400 measurements for each condition. The actin concentration around the beads is estimated from the fluorescence measurements for the different concentrations of Arp2/3 and gelsolin (Fig. 2, insets). The variation of actin density is at most a factor of 1.6 for gelsolin variation and 1.5 for Arp2/3 variation. Such a weak actin density variation with branching has already been observed in similar networks (25). Meanwhile, the gels strongly stiffen as the concentration of branching protein increases (from 1 kPa at 10 nM to 8 kPa at 100 nM), and the Young's modulus levels off at a concentration above 100 nM (Fig. 2A). The increase in capping also strongly stiffens the network (from 2 kPa at 20 nM to 7 kPa at 90 nM) before plateauing (Fig. 2B). Thus, the increase of the capping and branching protein

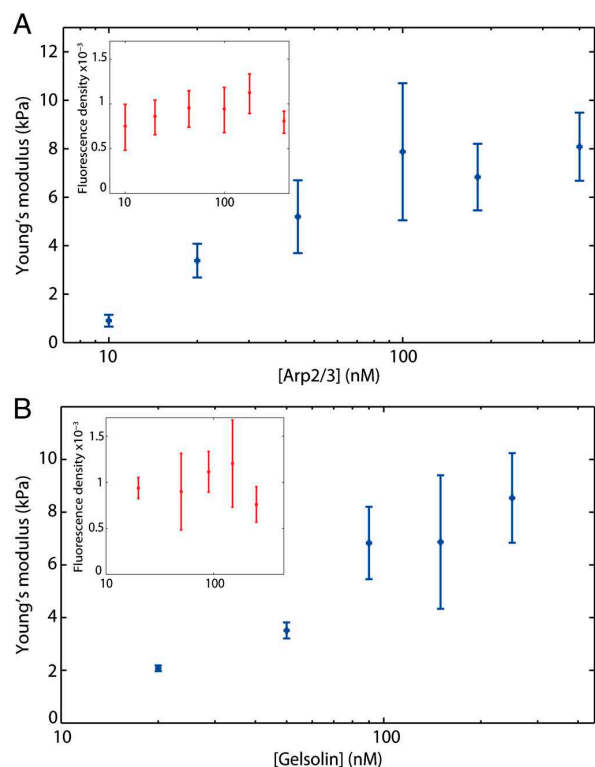


Fig. 2. Architecture of gels influences Young's modulus. Evolution of the Young's modulus with [Arp2/3] at [gelsolin] = 90 nM (A) and with [gelsolin] at [Arp2/3] = 180 nM (B). Each point represents the mean of 200–400 probed gels obtained from at least three reproductions of the same conditions. The error bars represent the 95% confidence interval on the mean elastic modulus. Inset: evolution of fluorescence density with [Arp2/3] and [Gelsolin], giving an estimate of actin concentration in the networks.

concentrations during the assembly process, while having weak effect on the actin density, induces a drastic stiffening of the actin networks. These dependences on protein concentrations will be discussed in light of existing models of polymer network elasticity in the discussion section.

Rigidification by Phalloidin. To further investigate the link between microscopic and macroscopic mechanical properties of the network, we study the role of the rigidification of filaments induced by phalloidin. We thus conduct experiments in the presence or in the absence of phalloidin. In the latter case, as the gel grows, the shape of the gels in already-formed chains can become nonspherical. Consequently, we adapt the protocol by stopping the magnetic field in between each measurement and only analyzing the newly-formed pair of beads, reduced to 22 in five different samples. A typical force distance curve is given in Fig. S2. We obtain a Young's modulus around half the value of the phalloidin-stabilized sample (3.4 ± 0.6 kPa, compared to 5.9 ± 0.8 kPa).

We then compare these networks measurements to the flexibility of individual filaments. The persistence length of actin filaments varies from 18 μm for actin stabilized by phalloidin to 9 μm for (ADP) actin with no phalloidin (26). In solution, cofilin strongly increases the bending flexibility of the filaments it interacts with. The persistence length of actin in presence of excess cofilin has been measured to be 2.2 μm (27). In our case, the concentration of cofilin is lower and the tension applied to the filaments both during the network growth and deformation may perturb the interaction of cofilin with actin filaments (28). Hence, in our experiments without phalloidin, the persistence length of actin filaments is comprised between 2.2 and 9 μm . For actin filaments in the presence of both cofilin and phalloidin, no value of the persistence length was present in the literature. We thus performed the measurements at the concentrations used in the colloidal-chain experiments and found a persistence length of 16.2 ± 1.4 μm (Materials and Methods and Fig. S3).

The stabilization by phalloidin therefore stiffens the network by a factor of approximately 2 while increasing the persistence length of individual filaments by a factor of 2 to 8 (depending on the interaction of cofilin with the filaments). The experimental dependence of the network elasticity on the persistence length is therefore linear or less.

Influence of Time Growth. Because polymerization of the actin gels proceeds from the surface of the bead, the older network is pushed away from the surface by the new polymerizing network. The external layer of the growing gel is therefore tangentially stretched while the inner layers are radially compressed (29). The tangential stress can lead to the development of a notch and ultimately to the fracture of the gel (30). Here, studying gels at different growth times gives indications of the internal stress dependence of the mechanics of branched actin networks. Specifically, polymerization is stopped by dilution in phalloidin after different growth times from 4–30 min. We test two concentrations of Arp2/3 (44 and 400 nM) while gelsolin is kept constant (90 nM). The high Arp2/3 concentration results in a situation where very few gels break. In this case, the elastic modulus evolves slightly while the mean thickness of the gel significantly increases up to 25 min after the initiation of polymerization (Fig. 3A). We estimate the average tangential and radial stresses in our experiments by using the calculations of Noireaux et al. (29) with the elastic modulus and thickness measured for each gel in our experiments. We compute that the average tangential stress changes from 700 Pa after 3 min of polymerization to 1,500 Pa after 30 min, while the average radial stress changes from 250 Pa to 1,000 Pa (Fig. 3B). In the same time, the measured elastic modulus evolves slightly from 5.7 ± 0.6 kPa to 6.6 ± 0.6 kPa. This result signals a weak stress-stiffening when compared to measurements on cross-linked networks.

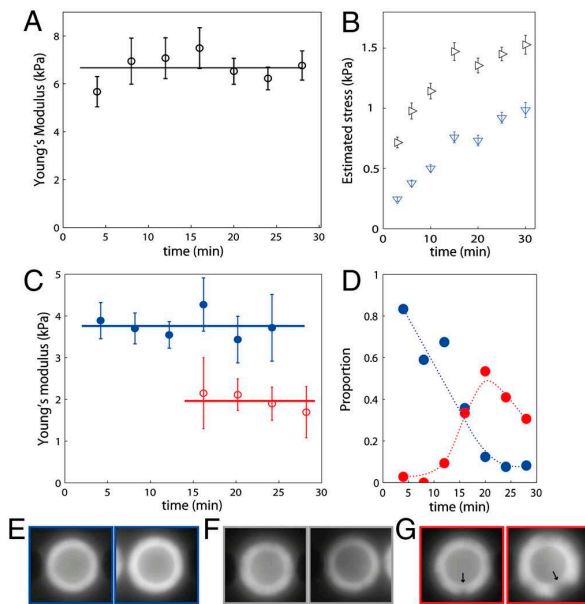


Fig. 3. Effect of gel growth. (A) Evolution of the Young's modulus with growth time at $[\text{Arp2/3}] = 400 \text{ nM}$ and $[\text{gelsolin}] = 90 \text{ nM}$. (B) Corresponding evolution of the estimated mean tangential (black horizontal triangles) and radial (blue Down triangles) stresses. (C) Evolution of Young's modulus with growth time at $[\text{Arp2/3}] = 44 \text{ nM}$ and $[\text{gelsolin}] = 90 \text{ nM}$: blue close circles, homogenous gels; red open circles, broken gels. The lines are the mean value. (D) Proportion of homogenous gels (blue) and broken gels (red) as a function of growth time in all probes gels (including the undetermined ones). The dotted lines are guides for the eye. (E–G) Classification between homogenous (E), undetermined (F), and broken (G) gels. In (G), the arrows indicate failures in the gel. The images are $8 \times 8 \mu\text{m}$.

In the low Arp2/3 case, the majority of gels are unbroken 12 min after the start of polymerization, while very few remain intact after 20 min of growth (Fig. 3D). During the analysis each gel is classified either homogenous or broken, based on fluorescent images (Fig. 3E–G). For some gels the classification is ambiguous and those gels are disregarded. We obtain two curves of the Young's modulus as a function of growth time for broken and unbroken gels (Fig. 3C). Similar to the high Arp2/3 case, the elasticity of homogenous gel exhibits no significant evolution, although its thickness and thus its internal stress increases (from 320 Pa at 4 min to 650 Pa at 12 min). After the gels break, the elastic modulus is divided by a factor of two ($2.0 \text{ kPa} \pm 0.5$ for broken gels compared to $3.8 \text{ kPa} \pm 0.4$ for unbroken gels). After the appearance of the first notch, stresses in the gel due to geometrical constraints are released although the gel is still not detached and a stress could remain. The measurements at different growth times thus indicate a weak stress-stiffening of the probed gels: the Young's modulus does not evolve significantly with time even though the radial internal stress is increased four times and its maximum variation corresponds to a factor of two when a large part of the internal stress is released.

Discussion

In this paper, we study the relationship between network architecture and elasticity of lamellipodium-like actin networks. We report, for the first time, the dependence of the elasticity of such networks on the concentration of capping and branching proteins. We show a strong stiffening of the networks when either capping or branching concentrations are increased. The more Arp2/3 is present, the more branched the networks are. This results in a weak increase of the actin density within the network whereas the networks strongly stiffen. When $[\text{Arp2/3}]$ is increased

further, the Young's modulus reaches a plateau, which can be attributed to a saturation of Arp2/3 activation by the VCA present on the colloids. We also look at the effect of the protein gelsolin, which caps growing ends of the filaments. We find a four-fold stiffening of the networks when gelsolin concentration is increased from 20 to 90 nM. Increasing the concentration of gelsolin will increase the rate of capping and thus reduce the length of the actin filament from the branching point to its capped end. This reduced length will decrease the connectivity of the network and thus induce its softening (31). Additionally, due to the semiflexibility of the filaments, the orientation of adjacent strands remains correlated; shorter strands will induce shorter long-range correlation, which will also result in the softening of the network (12). Both these effects would point to a softening when the concentration of gelsolin increases, in contrast to the observed stiffening. Nevertheless, the protein gelsolin has also been shown to reduce the distance between branches in reconstituted systems (25, 32). The major mechanical effect of increasing gelsolin is neither the decreasing connectivity nor the decrease of the filaments total length but rather the reduction of the distance between branching points.

The various mechanical models that describe the elasticity of semiflexible polymer networks are built on different microscopic origins of elasticity. They are all based on the same parameters: the persistence length of the filaments, l_p , the mesh size of the network, ξ , and a characteristic length of the network, L . In cross-linked networks, L is the distance between crosslinks. The mesh size ξ for this type of polymer is given by $\xi \sim (a c_A)^{-1/2}$ where a is the size of the actin monomer and c_A the actin concentration (33, 34). The entropic elasticity model has been used to interpret dilute actin network rheology. In this model, the elastic modulus reads $E \sim kT \xi^{-2} l_p^2 L^{-3}$ (23), where kT is the thermal energy. For models where the elasticity arises from the enthalpic bending of the filaments, the elastic modulus has been proposed to scale as $E \sim kT \xi^{-2} l_p L^{-2}$ (13, 35). However, the elastic modulus of this mode of deformation may be overestimated, due to its non-affine nature: the deformation is localized in some parts of the gel. When the elasticity comes from the enthalpic stretching, the modulus can be rewritten from (13) as $E \sim kT \xi^{-2} l_p a^{-2}$. A regime in which enthalpic bending and enthalpic stretching are coupled has also been found in 3D simulations with an intermediate dependence on L (13). In the following discussion we will interpret our experimental results in light of these models.

In our experiments we found a weak dependence (linear or less) of network elasticity on persistence length. An entropic origin would lead to a quadratic dependence of the elasticity to l_p , which is far from our measurements. Instead, this result strongly suggests a dominant enthalpic contribution to the origin of elasticity in the branched actin networks.

As pointed out by Bausch and Kroy, the identification of the characteristic length L is delicate (16). An obvious choice for cross-linked networks is the mean distance between two crosslinks. In the case of lamellipodium-like networks, the characteristic length, L , can be chosen as the distance between branching points. Raising the concentration of Arp2/3 is expected to increase the number of branches and thus to decrease L . More precisely, measurements of the polymerization kinetics show that the number of free barbed ends, and thus of branches, is proportional to the Arp2/3 concentration at low values (36). It has also been observed by microscopy that the distance between branching points is smaller with more Arp2/3 complexes (37). We measure a ten-fold stiffening of branched actin networks when the concentration of Arp2/3 is increased ten-fold, while actin concentration in the shell varies only by a factor of 1.5. This stiffening is too strong to be attributed to the variation of actin concentration because the dependence of the elastic modulus on the actin concentration is linear in all the models described above. We thus interpret most of the dependence between E and $[\text{Arp2/3}]$ as the

consequence of the decrease of L . Our results are not compatible with a purely entropic regime that exhibits a strong dependence on L ($E \sim L^{-3}$). Our results are more in agreement with enthalpic modes of deformation, especially the coupled bending stretching regime. The already mentioned plateau above 100 nM [Arp2/3] could also be due to a crossover to a purely enthalpic stretching mode, in which the elasticity is independent of L .

The crossovers between the entropic and both enthalpic regimes of elasticity in semiflexible networks have been studied theoretically as a function of filament length and distance between crosslinks (31). Decreasing the distance between crosslinks modifies the origin of elasticity from entropic to enthalpic stretching, as the thermal fluctuations of the filaments become negligible. Similarly, in cross-linked networks, reducing the length of the filaments changes the origin of the elasticity from entropic stretching to enthalpic bending. Indeed, as the length of the filaments decreases, the connectivity of the network decreases until filaments are not connected in a unique network anymore. Just above this transition, the network is loosely connected and the softest mode of deformation is the mechanical bending of the filaments. Typical rheological experiments on actin networks are carried out at concentrations around 10–20 μM , and their elasticity has been shown to be entropic (10). Actin networks grown from a surface by Arp2/3 are more concentrated: we estimated a concentration of 170 μM in our experiments, giving a mesh size of 60 nm [$\xi \sim (a c_A)^{-1/2}$ with $a = 2.7$ nm/monomer]. These branched networks are also less connected than cross-linked networks, even at the same concentration, as each node connects three strands instead of four. Hence, both the concentration and the connectivity of branched actin networks may explain an important enthalpic contribution to their mechanics.

The last result of this study is the evolution of elasticity during growth and after gel breakage. While in our experiments, the continued growth of the gels results in a buildup of internal stress, no significant increase in the elastic modulus is measured. Comparing intact gels with internal stresses on the order of one kPa to fractured gels with a released stress, a softening of a factor of two is measured. This effect is comparable to the nonlinear effects seen by Chaudhuri and colleagues in similar branched networks where the elastic modulus varies by a factor of less than three at similar stresses (from 0.9 kPa at stress below 10 Pa to 2.5 kPa at 600 Pa, with a maximum of 4 kPa at 250 Pa) (18). These reduced stress-stiffening effects on dense branched networks are markedly different from what is observed in dilute cross-linked actin networks: stiffening as large as two orders of magnitude has been reported (10). Such a strong stress-stiffening is considered a signature of the entropic elasticity, since small strain drastically reduces the available configurations in nearly extended polymers. On the contrary, the enthalpic elasticities originating from the mechanical bending or extension and compression of polymers do not present this kind of intrinsic nonlinearity. The observed weak stress-stiffening of the networks is in agreement with the measured dependence of E on l_p and [Arp2/3] that converge into a strong enthalpic contribution to the elasticity of actin branched networks.

Conclusion

We have developed a new technique based on the dipolar attraction of superparamagnetic colloids to probe the mechanics of actin gels assembled around colloids. As each pair of beads is a sensor by itself, this method allows us to carry out tens of measurements in one sample. Using this method, we investigate dense dendritic actin networks resembling the ones found in lamellipodium of a crawling cell. We found elastic moduli in the range of 1–10 kPa, in good agreement with published values on similar reconstituted systems and compatible with cells and tissues elasticity. The massive parallel measurements allowed by our technique enable the investigation of the impact on network elasticity with variations of capping and branching concentrations, indi-

vidual filament flexibility, and internal stress. All these dependencies point toward an elasticity of branched actin networks whose main contribution arises from mechanical bending, stretching, and compression of individual filaments. This type of elasticity does not exhibit strong stress-stiffening, in contrast to entropic elasticity, which is the main contribution to elasticity in cross-linked actin networks.

The increase in capping and branching concentrations stiffens the networks while only changing the actin concentration slightly within the network. This is direct evidence of the strong dependence between the branched networks architecture and elasticity. More precisely, the dominant effect of the architecture on the elasticity is the reduction of the distance between branching points when concentration of branching or capping is increased. The concentrations of branching (10–100 nM) and capping proteins (20–100 nM) at which we find strong variations of the elastic modulus are compatible with intracellular regulation. These findings indicate that a cell can modulate its cytoskeleton elasticity by intracellular regulation of the branching dynamics.

Materials and Methods

Materials. The superparamagnetic colloids (Dynabeads M-450 Epoxy 4 ± 0.02 μm diameter measured in a chain) are purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). VCA domain of the human WASP protein (GST tagged), Arp2/3 protein complex from bovine brain, gelsolin recombinant human protein and cofilin1 recombinant human protein are purchased from Cytoskeleton (Denver, CO, USA). Rabbit muscle G actin and fluorescent G actin (Alexa 488 and 594) have been provided by M-F Carlier's lab (Gif sur Yvette, France). All other chemicals are from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Sample Preparation. Colloids are coated by VCA: 3.5 μL of beads stock solution (volumic fraction 0.013) are diluted in 47 μL of milliQ water, washed twice with X buffer (Hepes 10 mM, KCl 100 mM, CaCl_2 0.1 mM, MgCl_2 10 mM) and then mixed with VCA (23 μM) in X buffer. After one hour of incubation, 5 μL of BSA 10% is added for passivation (15 min). By centrifugation the suspending medium is replaced by X buffer with 0.1% of BSA, and the volumic fraction of beads is 0.1%. Bare beads are coated with 1% BSA following the same protocol.

G-actin is polymerized at 29 μM (including 5% labeled monomers) using KME (KCl 2 M, MgCl_2 20 mM, EGTA 4 mM). The gel growth occurs at 6.5 μM of actin, 6.5 μM of cofilin, 20–250 nM of gelsolin, 10–400 nM of Arp2/3, and 0.01% VCA covered beads (Hepes 6 mM, ATP 1.8 mM, DTT 6.2 mM, Dabco 140 μM , KCl 80 mM, CaCl_2 100 μM , MgCl_2 6 mM, and EGTA 42 μM at pH 7.8).

The polymerization is stopped between 3–30 min by a 10 times dilution in X buffer with 20 μM phalloidin. Actin-covered colloids are then concentrated and bare beads are added at the same volumic fraction of 0.01%. The sample is introduced in homemade chambers ($22 \times 1 \times 0.25$ mm^3) coated with BSA.

Magnetic Setup. The setup is mounted on an Axio A1 inverted microscope from Zeiss (Carl Zeiss, Germany) with an oil-immersion 100x objective (NA = 1.4) and equipped with X-cite XPS-120 lamp for fluorescence. The magnetic field is generated by two coaxial coils (SBEA, Vitry, Fr) with mu metal core (length 40 mm, diameter 26–88 mm, 750 spires). The coils are powered by a bipolar operational power supply amplifier 6A/36V (Kepco, Flushing, NY) controlled by Labview software (National Instruments, Austin, TX). The maximum field generated is 100 mT with a gradient less than 0.1 $\text{mT}\cdot\text{mm}^{-1}$ over the sample. The chains are formed with a constant field of 3 mT and the acquisition goes from 1 mT to 80 mT in 5 s. The CCD camera is a Coolsnap ES² (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany) used at a frame rate of 27 Hz. The measurement of the tension used to control the field is synchronized with the frame acquisition. After each measurement, a fluorescent image ($\delta t = 100$ ms) of the chain is acquired.

Fluorescence Measurements. The fluorescence density is the average value of fluorescence on the thickness of the shell in an angular sector of $\pi/3$ perpendicular to the chain (the thickness is extracted from mechanical analysis detailed below). An estimation of the actin concentration in the shell is obtained by measuring the fluorescence intensity of known concentrations of labeled G-actin between the slide and the coverslip with 4 μm beads as spacers.

Experiment Analysis. Image analysis is carried out using Image J (NIH) and data processing using Matlab (MathWorks, MA). The center of each particle is determined by a weighted mean of gray levels giving a precision of 20 nm.

The attractive dipolar force between two particles reads $F_d = 3 \mu_0 m^2 / (2\pi d^4)$, where μ_0 is the permittivity of the empty space, m the magnetic moment of the particles, and d the distance between their center. Also, $m = V H \chi_m$, with V the volume of the particle, H the magnetic excitation, and χ_m the magnetic susceptibility measured by Fønnum et al (38). The force on one gel is calculated by the sum of the force between the pair of beads and their first neighbors.

To fit force indentation curves, we use the relationship for Hertzian contact modified to take into account the finite thickness of the elastic medium (incompressible bonded sample, ref. 22):

$$F_i = 16/9 ER^{1/2} \delta^{3/2} (1 + 1.133 \chi + 1.283 \chi^2 + 0.769 \chi^3 + 0.0975 \chi^4),$$

where F_i is the force, E the Young's modulus, R the equivalent radius, δ the indentation, and $\chi = \delta^{1/2} R^{1/2} / h^{-1}$, with h being the thickness of the gel. The Poisson ratio was assumed to be 0.5 (39). The indentation is the distance between beads compared to their distance when gels are undeformed. Both the elastic modulus and the thickness of the gel were used as adjustable parameters. The equivalent radius is calculated as $R = [R_b^{-1} + (R_b + h_0)^{-1}]^{-1}$, with R_b being the radius of the beads and h_0 being the thickness of the shell evaluated at small forces. All estimations of the fit were conducted from

0–500 pN to allow comparisons between different gels. The strain rate is 0.01 Hz, and the mean stress is around 500 Pa.

It should be noted that when a contacting sphere deforms an elastic shell, the stress and strain applied during deformation are not homogenous in the elastic medium. The strain is maximum at the center of the area of contact, and minimal at the rim. On an axis spanning the center of the two spheres, it is highest at the surface of contact and decreases inside the medium (40). It is therefore difficult to characterize the nonlinear behavior of elastic materials using spherical contacts. Hence, the elastic properties measured in this study should be considered to be an average over different stresses and strains acting on the network.

We check for each curve the maximum indentation to ensure that the correction for finite thickness is accurate and that the area of contact calculated from Hertz theory is valid, and therefore, that quantitative comparison between the mechanics of different architecture networks is reliable (SI Text).

To compute the mean elastic modulus and the 95% confidence interval of each experimental condition, we aggregated the mean and standard error of each of 3–4 repetitions of the same condition and used a random effect meta-analysis (41).

ACKNOWLEDGMENTS. The authors want to thank Marie-France Carlier and Guillaume Romet-Lemonne for the gift of actin and fluorescent actin, Cecile Sykes, Marie-France Carlier, Guillaume Romet-Lemonne, Christian Frétigny, and Jean Baudry for useful discussions, Julien Browaeys for statistical help, and Joseph Tavecchi for the careful reading of the manuscript. Funding comes from Agence Nationale de la Recherche ANR-09-PIRI-0001 Actimag, Programme SESAME Région Ile-de-France SMACS.

- Fletcher D, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463:485–492.
- Welch MD, Mallavarupuf A, Rosenblatt J, Mitchison TJ (1997) Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 9:54–61.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509–514.
- Svitkina TM, Borisy GG (1999) Organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *Cell* 145:1009–1026.
- Svitkina TM, Verkhovsky AB, McQuade KM, Borisy GG (1997) Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: Mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* 139:397–415.
- Le Clainche C, Carlier M-F (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88:489–513.
- Levental I, Georges PC, Janmey PA (2007) Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 3:299–306.
- Storm C, Pastore JJ, MacKintosh FC, Lubensky TC, Janmey PA (2005) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435:191–194.
- Gardel ML, et al. (2006) Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1762–1767.
- Gardel ML, et al. (2004) Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science* 304:1301–1305.
- Head D, Levine A, MacKintosh F (2003) Deformation of cross-linked semiflexible polymer networks. *Phys Rev Lett* 91:2–5.
- Wilhelm J, Frey E (2003) Elasticity of stiff polymer networks. *Phys Rev Lett* 91:1–4.
- Broedersz CP, Mao X, Lubensky TC, MacKintosh FC (2011) Criticality and isotacticity in fibre networks. *Nat Phys* 7:983–988.
- Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401:613–616.
- Bernheim-Groswasser A, Wiesner S, Golsteyn RM, Carlier M-F, Sykes C (2002) The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417:308–311.
- Bausch AR, Kroy K (2006) A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics* 2:231–238.
- Marcy Y, Prost J, Carlier M-F, Sykes C (2004) Forces generated during actin-based propulsion: A direct measurement by micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5992–5997.
- Chaudhuri O, Parekh SH, Fletcher D (2007) Reversible stress softening of actin networks. *Nature* 445:295–298.
- Dreyfus R, Lacoste D, Bibette J, Baudry J (2009) Measuring colloidal forces with the magnetic chaining technique. *Euro Biophys J: E, Soft Matter* 28:113–123.
- Brangbour C, et al. (2011) Force-velocity measurements of a few growing actin filaments. *PLoS Biol* 9:e1000613.
- Leal Calderon F, Stora T, Mondain Monval O, Poulin P, Bibette J (1994) Direct measurement of colloidal forces. *Phys Rev Lett* 72:2959–2962.
- Dimitriadis EK, Horkay F, Maresca J, Kachar B, Chadwick RS (2002) Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Bio-phys J* 82:2798–2810.
- MacKintosh FC, Käs J, Janmey PA (1995) Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Phys Rev Lett* 75:4425–4428.
- Janmey PA, McCulloch CA (2007) Cell mechanics: Integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng* 9:1–34.
- Wiesner S, et al. (2003) A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J Cell Biol* 160:387–398.
- Isambert H, et al. (1995) Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. *J Biol Chem* 270:11437–11444.
- McCullough BR, Blanchoin L, Martiel J-L, De la Cruz EM (2008) Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: Implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol* 381:550–558.
- Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M (2011) Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J Cell Biol* 195:721–727.
- Noireaux V, et al. (2000) Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys J* 78:1643–1654.
- van der Gucht J, Paluch E, Plastino J, Sykes C (2005) Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7847–7852.
- Head D, Levine AJ, MacKintosh F (2003) Distinct regimes of elastic response and deformation modes of cross-linked cytoskeletal and semiflexible polymer networks. *Phys Rev E* 68:1–15.
- Achard V, et al. (2010) A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol* 20:423–428.
- Schmidt CF, Barmann M, Isenberg G, Sackmann E (1989) Chain dynamics, mesh size, and diffusive transport in networks of polymerized actin. A quasielastic light scattering and microfluorescence study. *Macromolecules* 22:3638–3649.
- de Gennes PG, Pincus P, Velasco RM (1976) Remarks on polyelectrolyte conformations. *J Physique (Paris)* 37:1461–1473.
- Joly-duhamel C, Hellio D, Ajdari A, Djabourov M (2002) All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir* 18:7158–7166.
- Higgs HN, Blanchoin L, Pollard TD (1999) Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* 38:15212–15222.
- Blanchoin L, et al. (2000) Direct observation of dendritic actin complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 403:1007–1011.
- Fønnum G, Johansson C, Molteberg A, Morup S, Aksnes E (2005) Characterisation of Dynabeads by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. *J Magn Magn Mater* 293:41–47.
- Gardel M, Valentine M, Crocker J, Bausch A, Weitz D (2003) Microrheology of entangled F-actin solutions. *Phys Rev Lett* 91:8–11.
- Lin DC, Shreiber DI, Dimitriadis EK, Horkay F (2009) Spherical indentation of soft matter beyond the Hertzian regime: Numerical and experimental validation of hyperelastic models. *Biomech Model Mechanobiol* 8:345–358.
- Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR (2009) *Introduction to Meta-Analysis* (Wiley, New York).