



HAL
open science

Motilité sous flux et étalement de *Dictyostelium discoideum*

Sébastien Fache

► **To cite this version:**

Sébastien Fache. Motilité sous flux et étalement de *Dictyostelium discoideum*. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00009558

HAL Id: tel-00009558

<https://theses.hal.science/tel-00009558>

Submitted on 21 Jun 2005

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

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

THESE

présentée par

Sébastien FACHE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I
Discipline : Physique
(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le

8 juin 2005

Motilité sous flux hydrodynamique et étalement de *Dictyostelium discoideum*

JURY :	Pierre Bongrand	Rapporteur
	Thierry Soldati	Rapporteur
	Bertrand Fourcade	Examineur
	Pascal Martin	Examineur
	Alexander Verkhovsky	Examineur
	Franz Bruckert	Directeur de thèse

**Laboratoire : CEA Grenoble / DRDC / BBSI / Groupe Dictyostelium, 17 rue des
Martyrs 38054 Grenoble Cedex 09**

Table des matières

1	INTRODUCTION	6
1.1	Définition de la motilité cellulaire, questions que soulèvent le mouvement des cellules	6
1.2	Les motilités de <i>Dictyostelium discoideum</i>	7
1.3	Le cytosquelette d'actine et sa dynamique.....	9
1.4	Les moteurs moléculaires et leur rôle dans les protrusions et rétractions cellulaires.....	17
1.5	L'adhérence cellulaire et la signalisation liée au contact cellule-substrat	21
1.6	Les forces exercées par la cellule	25
1.7	Sensibilité des cellules aux forces.....	27
1.8	Motilité induite par un flux de cisaillement chez <i>Dictyostelium discoideum</i>	30
1.9	Objectif du travail de thèse	32
2	MATERIEL ET METHODES	34
2.1	Cultures cellulaires et préparation des cellules	34
2.1.1	Modes de cultures et milieu nutritif	34
2.1.2	Types cellulaires.....	35
2.1.3	Mesure de la concentration cellulaire.....	37
2.1.4	Préparation des cellules	37
2.2	Traitement des surfaces	38
2.3	Expériences de motilité sous flux. Détermination statistique de la vitesse et de l'orientation des cellules.....	38
2.3.1	Chambre à flux latéral à lame	38
2.3.2	Calcul de la contrainte appliquée au cellules	39

2.3.3	Préparation des cellules et déroulement de l'expérience	40
2.3.4	Changement de milieu, utilisation du calcium et détermination de la concentration	40
2.3.5	Acquisition et traitement des images	41
2.3.6	Traitement des données, champ de vitesse et orientation des cellules.....	43
2.4	Expériences de motilité sous flux, analyse de la morphologie cellulaire et dynamique des zones de contact	44
2.4.1	Chambre à flux latéral à lamelle	44
2.4.2	Acquisition des images de cellules individuelles à fort grossissement.....	44
2.4.2.1	Illumination en contraste de phase	45
2.4.2.2	RICM.....	45
2.4.3	Analyse des images RICM.....	47
2.4.3.1	Extraction des contours des zones de contact cellule-substrat.....	47
2.4.3.2	Mesure du taux d'aires gagnées et perdues au cours du mouvement.....	48
2.4.3.3	Détermination de la taille et de la fréquence des protrusions et des rétractions	50
2.5	Adhérence cellulaire.....	50
2.5.1	Chambre à flux radial, préparation des cellules et déroulement de l'expérience	51
2.5.2	Calcul de la contrainte appliquée aux cellules	51
2.5.3	Acquisition et traitement des images	54
2.5.4	Détermination de la contrainte seuil apparente de détachement.....	55
2.6	Mesure de la cinétique de l'étalement cellulaire	56
2.6.1	Protocole expérimental.....	56
2.6.2	Acquisition et traitement des images	57
2.6.3	Analyse de la surface de contact cellule-substrat.....	57
3	PARTIE I : Vitesse et orientation des cellules sous contrainte hydrodynamique.....	59
3.1	Effet de la concentration de calcium externe sur les cellules sauvages AX2	59
3.1.1	Réponse des cellules à une force appliquée	59
3.1.2	Application d'une contrainte à $[Ca]_{ext}$ libre constant.....	60
3.1.3	Variation de la concentration de calcium libre à force constante.....	62
3.1.4	Sensibilité des cellules aux forces.....	68
3.2	Comportement de cellules mutantes.....	72
3.2.1	Cellules mutantes $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$	72
3.2.2	Cellules $R-IP_3\Delta$	76
4	PARTIE II : Morphologie cellulaire et dynamique des zones de contact de cellules en mouvement sous flux	80
4.1	L'augmentation de $[Ca]_{ext}$ change la morphologie des cellules.....	80
4.2	Première mise en évidence d'une périodicité dans la dynamique du bord cellulaire	81
4.3	Etude de la dynamique des zones de contact chez les cellules sauvages en fonction de $[Ca]_{ext}$	82

4.3.1	Mise en évidence de fluctuations périodiques dans le taux d'expansion et de contraction de l'aire de contact	82
4.3.2	Effet du calcium sur la taille des protrusions et rétractions	85
4.3.3	Effet du calcium sur la fréquence des protrusions et rétractions.....	86
4.4	Etude de la dynamique des zones de contact chez les mutants R-IP₃Δ et GβΔ	87
4.4.1	Effet de l'invalidation des gènes Gβ et iplA sur la taille des protrusions et des rétractions	87
4.4.2	Effet de l'invalidation des gènes Gβ et iplA sur la fréquence des protrusions et rétractions	89
4.4.3	Taille et Périodicité des protrusions et rétractions en fonction de la vitesse cellulaire	90
5	PARTIE III : Evolution de la zone de contact cellule-substrat en fonction du temps au cours de l'étalement cellulaire	93
5.1	Analyse qualitative	93
5.2	Analyse quantitative.....	103
5.3	Rôle du calcium dans l'étalement des cellules sauvages	106
5.4	Effet de la cytochalasine A sur l'étalement des cellules sauvages.....	112
5.5	Etalement des cellules mutantes GβΔ et GβΔ+Gβ, rôle des protéines G hétérotrimériques dans l'étalement.....	114
5.6	Rôle de la myosine 2 dans l'étalement, étude sur les cellules myo2null	119
6	DISCUSSION.....	124
6.1	Localisation et nature possible de la cible du calcium extracellulaire impliqué dans la motilité induite par un flux.....	125
6.2	Régulation de la vitesse cellulaire par le calcium extra et intra cellulaire.....	128
6.3	Rôle joué par le calcium dans la mécanosensibilité cellulaire. Origine de la mécanosensibilité chez Dictyostelium discoideum	131
6.4	Comparaison entre les cellules végétatives et développées de Dictyostelium discoideum et d'autres types cellulaires	133
6.5	Dynamique des bords cellulaire et étalement sur un substrat	139
6.6	Perspectives.....	145

1 INTRODUCTION

1.1 Définition de la motilité cellulaire, questions que soulèvent le mouvement des cellules

La motilité d'un être vivant est la capacité physiologique qu'a ce dernier à se mouvoir, alors que la mobilité ne renvoie qu'au mouvement d'un objet quelconque à un moment donné. Ainsi, une cellule sera dite motile si elle dispose de structures moléculaires lui permettant d'utiliser l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour son mouvement, et sera en plus mobile si elle est en mouvement au moment de l'observation.

Dans un milieu liquide, le mouvement cellulaire dépend de la viscosité, et non des forces d'inertie. Une estimation du nombre de Reynolds le montre :

$$\text{Re} = \frac{f_{\text{inertie}}}{f_{\text{viscosité}}} = \frac{\rho v^2 L^2}{\nu L \eta} = \frac{\rho v L}{\eta}$$

où ρ est la densité du liquide et η sa viscosité, v la vitesse de la cellule, L sa taille. Dans le cas de cellules dont la taille est de l'ordre du micron ou de la dizaine de microns, le nombre de Reynolds est très inférieur à 1, ce qui signifie que ces cellules ne subissent que les forces visqueuses, les forces d'inertie étant négligeables. Le mouvement n'engendre aucune turbulence, et ainsi les moyens de propulsions diffèrent de ceux des animaux macroscopiques.

Les cellules vivantes sont capables de se mouvoir dans leur milieu environnant, et les techniques de microscopie actuelles nous montrent une grande variété de cellules présentant des modes de déplacement indépendants et dirigés. Nous distinguerons dans cette partie la motilité des cellules dans un liquide (motilité en trois dimensions) et la migration cellulaire sur des surfaces rigides (motilité en deux dimensions), dont nous parlerons plus en détail.

Certaines cellules avancent au sein du liquide grâce au mouvement répétitif de cils ou de flagelles (spermatozoïdes, bactéries). D'autres, comme les amibes, les kératocytes, les fibroblastes, sont incapables d'évoluer dans un milieu liquide en trois dimensions. Elles adhèrent sur un substrat (dans la nature : sur des plantes, des particules solides ou la matrice extracellulaire) et avancent en rampant sur ce substrat. C'est également le moyen de locomotion de nombreuses cellules à l'intérieur des organismes multicellulaires, tels les globules blancs qui migrent à travers les tissus à la recherche de divers pathogènes, les cellules embryonnaires au cours du développement, les neurones qui étendent un cône de croissance vers d'autres neurones, et même les cellules cancéreuses, qui migrent d'une tumeur

vers d'autres sites à travers l'organisme. Ces cellules n'ont pas un organelle particulier pour se mouvoir comme un flagelle, qui peut être étudié séparément du corps cellulaire. Elles avancent grâce à un cycle d'extensions et de contractions du cytoplasme qui déforme la membrane plasmique. Cette forme de motilité impose que la cellule adhère sur le substrat. C'est à l'interface cellule-substrat que sont localisés les efforts mécaniques exercés par la cellule sur son environnement.

Je vais présenter dans les paragraphes qui suivent les mécanismes moléculaires de la motilité cellulaire, principalement chez l'organisme modèle, *Dictyostelium discoideum*, que j'ai utilisé. Nous verrons d'abord quels types de motilité on rencontre chez *D. discoideum*, que la cellule soit dans l'état végétatif ou différencié, puis quels mécanismes moléculaires permettent la formation des protusions, appelés pseudopodes, et des rétractions du bord cellulaire. Je parlerai finalement des protéines permettant l'adhésion de la cellule sur un substrat. Je parlerai aussi des signaux intracellulaires impliqués dans la dynamique de ces assemblages moléculaires, et nous présenterons différentes expériences faites sur *D. discoideum* afin d'améliorer la compréhension des mécanismes de la migration cellulaire sur un substrat : chimiotactisme et motilité induite par un flux.

Je finirai en présentant les objectifs de ce travail de thèse, en présentant succinctement les thèmes abordés.

1.2 Les motilités de *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum est un eucaryote haploïde non pathogène qui vit naturellement dans les couches superficielles du sol des forêts tempérées. Lorsque les conditions nutritives sont favorables, *D. discoideum* est sous forme unicellulaire et se nourrit de microorganismes (bactéries et levures) qu'elle détecte grâce à une sensibilité chimiotactique. *D. discoideum* se nourrit donc par phagocytose, ce type particulier d'endocytose qui permet d'internaliser des particules solides. L'intensité de cette activité place *D. discoideum* au rang des cellules phagocytaires professionnelles, au même titre que les macrophages ou les neutrophiles. Les souches utilisées au laboratoire possèdent trois mutations leur permettant de se nourrir aussi par ingestion de phase fluide (pinocytose). Dans ces conditions, son cycle de vie est court (temps de doublement de 8 à 10 heures quand elles se nourrissent par pinocytose, 3 heures quand elles se nourrissent de bactéries). Lorsque la nourriture vient à manquer, *D. discoideum* cesse de se diviser, adopte une organisation multicellulaire et engage un cycle de développement. Celui-ci commence par une phase d'agrégation où environ 100 000 cellules

se regroupent grâce à une signalisation inter et intracellulaire basée sur l'AMP cyclique. L'agrégat ainsi formé est le siège d'une différenciation et d'une morphogénèse, et devient un limaçon, un organisme pluricellulaire capable de motilité phototactique à la recherche de bonnes conditions de germination. Si la nourriture continue à manquer, il s'engage dans un cycle de différenciation irréversible. Le limaçon se transforme en une forme fructifère, avec une tige constituée de cellules mortes, surmontée d'une masse de spores (environ 70 % des cellules de départ). Ces spores très résistantes redémarrent une vie unicellulaire dans des conditions favorables. Ainsi, *D. discoideum* fait partie de ces organismes pluricellulaires primitifs dont la multicellularité n'est pas le résultat de divisions cellulaires, mais d'une réunion d'individus isolés.

La motilité de *D. discoideum* est très importante, dans tous les cycles de la vie cellulaire.

- Dans l'état végétatif unicellulaire, la cellule est capable de se mouvoir sur une surface quelconque du moment qu'elle y est adhérente. Il s'agit d'une motilité exploratoire, qui permet à la cellule de rechercher de la nourriture. Le mouvement se fait par une succession de déplacements linéaires durant quelques minutes à la vitesse de 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ en moyenne.
- Les cellules végétatives sont également capables de repérer les bactéries grâce aux molécules qu'elles sécrètent (acide folique). De même, lorsque la nourriture manque et que les cellules s'agrègent, elles sont attirées par les sécrétions de leurs congénères (AMPc). C'est une motilité chimiotactique (Parent and Devreotes, 1999; Van Haastert, 1983).
- Les cellules *D. discoideum* sont également capables d'une motilité collective. Comme nous l'avons dit un peu plus haut, l'agrégat de cellules devient un limaçon capable de motilité phototactique. Les cellules ont un mouvement d'ensemble collectif qui se traduit par le mouvement global d'une structure multicellulaire (Bonner, 1998).

Au niveau évolutif, *D. discoideum* a émergé au moment de la divergence entre les animaux et les champignons (1 milliard d'années), et est généralement classé parmi les Myxomycètes. Pourtant, les comparaisons de séquences protéiques placent *D. discoideum* plus près des mammifères ou des plantes que des levures. *D. discoideum* est donc un organisme évolué possédant de nombreuses fonctions cellulaires élaborées tout en restant simple à cultiver. De plus, son génome est totalement séquencé, ce qui permet la création de nombreux mutants : son haploïdie et de nombreux outils pour l'approche génétique font que *D. discoideum* peut être utilisé en biologie moléculaire. L'ensemble de ces raisons lui a valu d'être reconnu comme un organisme modèle par le National Institute for Health (nih.gov).

1.3 Le cytosquelette d'actine et sa dynamique

Il existe plusieurs modèles de la reptation amibienne. Le premier proposé repose sur la contraction du front arrière d'une cellule en mouvement, induisant l'extension du front avant, c'est-à-dire l'émission de protrusions, dans lesquelles s'écoulent du cytoplasme.

Un autre modèle, impliquant les flux de membranes, a été proposé. Les cellules en mouvement endocytent de la membrane un peu partout sur leur surface, et les vésicules ainsi formées se dirigent vers le front avant de la cellule, grâce à l'actine et à la tubuline, et fusionnent avec la membrane plasmique. Il y a donc une exocytose polarisée de membrane qui va permettre la formation de protrusions. Le flux de membrane qui est concentré à l'avant de la cellule, est très dirigé. Ce flux de membrane génère des forces en appuyant sur les points focaux d'adhésion existant, et pousse la cellule vers l'avant (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998).

Dans le modèle mainstream de la polymérisation de l'actine, le cytosquelette d'actine va exercer des forces sur la membrane au front avant, et le complexe actine/myosine 2 va permettre la rétraction du front arrière de la cellule (Carlier, 1998).

La motilité de *D. discoideum* sur substrat a lieu en plusieurs phases. Il y a une phase d'élongation de l'avant de la cellule et formation d'une protrusion, qui avance et forme contact avec le substrat. Dans une autre phase, l'arrière de la cellule se contracte et se décolle du substrat pendant que l'avant de la cellule se contracte également tout en restant en contact avec le substrat. La cellule répète ce cycle tant qu'elle est en mouvement (figure 1.1). Le cycle du mouvement de *D. discoideum* peut être décrit de la façon suivante (Uchida et al., 2003) :

- Il y a une phase d'extension, où la force vient de la polymérisation de l'actine dans les protrusions. La cellule prend appui et exerce des forces sur le substrat pour pouvoir émettre une protrusion. Pendant cette phase, il y a également création de points focaux d'adhésion pour que la protrusion adhère sur la surface (a-c de la figure 1.1)
- La phase d'extension est suivie de la phase de rétraction, et il y a une contraction du bord cellulaire arrière, due au complexe actine/myosine 2. Cela cause le détachement de la membrane à l'arrière (d de la figure 1.1). Quand la cellule refait contact avec le substrat, cela génère une force de poussée qui va permettre une extension de la partie antérieure, et le cycle recommence (e de la figure 1.1).

Dans le modèle d'Uchida, les rétractions du bord cellulaire initie les protrusions sur le bord opposé.

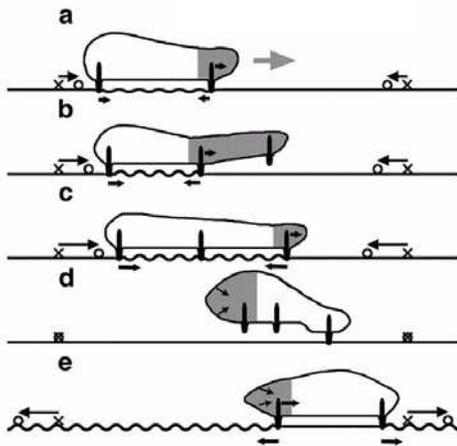


Fig 1.1 : *Modèle du cycle du mouvement cellulaire, pour des cellules de Dictyostelium (Uchida et al. 2003).*

Ces mouvements sont dirigés par le cytosquelette. C'est un réseau de protéines qui forment un réseau filamenteux à travers le cytoplasme des cellules animales et végétales. D'un point de vue mécanique, le cytosquelette donne sa forme à la cellule, et ses propriétés élastiques dirigent le mouvement. D'un point de vue biochimique, le cytosquelette est le siège de nombreuses réactions qui se répètent tant que la cellule est en mouvement. Ces réactions incluent la polymérisation dirigée de protéines, leur association en de plus grosses structures grâce à des protéines de liaison, et le mouvement polarisé de protéines motrices le long des protéines polymérisées. Les modifications de l'architecture du cytosquelette trouvent l'énergie nécessaire dans l'hydrolyse de l'ATP.

Chez *D. discoideum*, le cytosquelette est constitué de microfilaments et de microtubules.

Les microtubules sont de long polymères de tubuline, très rigides, de grande longueur de persistance (6 μm), qui croissent à partir du centre organisateur des microtubules, placé près du noyau : le diamètre extérieur vaut 25 nm et le diamètre intérieur 15 nm. Les microtubules sont impliqués dans la détermination de la forme de la cellule, mais également dans le transport des vésicules et des organelles de la périphérie vers le noyau et réciproquement. Ils sont également essentiels pour la séparation des chromosomes lors de la mitose cellulaire. Ils semblent en revanche peu impliqués dans la motilité sur substrat, puisque la dépolymérisation des microtubules avec du nocodazole n'empêche pas le mouvement.

Les microfilaments sont des polymères d'actine, fins (8 nm) et flexibles. Leur longueur de persistance, bien plus faible que celle des microtubules, vaut 18 μm . On les trouve en particulier près de la membrane plasmique où ils forment un réseau tridimensionnel dense (figure 1.2). L'actine intervient dans tous les types de mouvements existants chez les eucaryotes. Il ne s'agit pas uniquement de la migration cellulaire, mais également, par exemple, de la contraction musculaire, la phagocytose, la mitose cellulaire. Les filaments

d'actine, en s'associant avec la membrane plasmique, sont responsables du mouvement de la surface cellulaire (Bray, Cell movements).

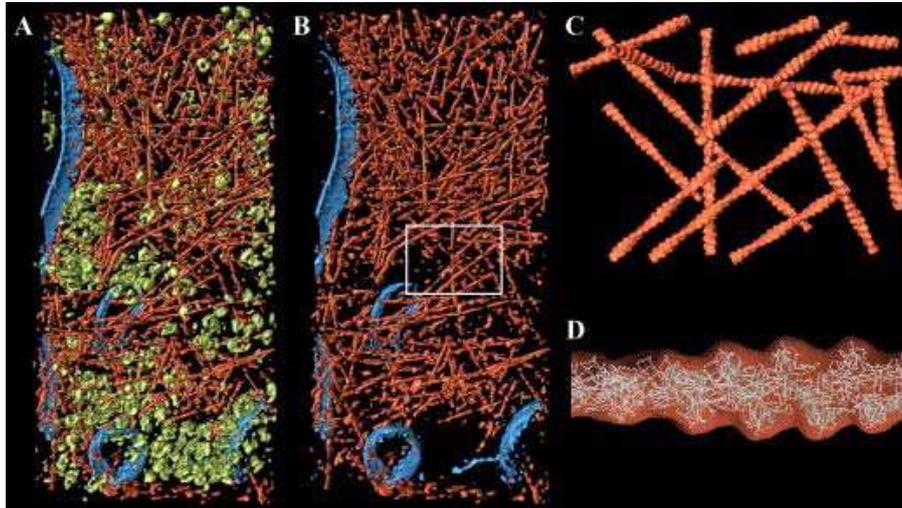


Fig 1.2 : **A.** Cytoplasme de *Dictyostelium* observé par cryoélectromicroscopie, en rouge le cytosquelette d'actine, en bleu les membranes, en vert les complexes macromoléculaires. **B.** visualisation du réseau d'actine filamenteuse. **C.** Grossissement d'une partie de l'image B (cadre blanc). On voit les filaments d'actine organisés en réseau, à une résolution de 2 nm. **D.** Filament d'actine (Kürner et al., 2004).

Dans la plupart des cellules eucaryotes, l'actine est une protéine très abondante. Chez *D. discoideum*, la concentration totale d'actine est de 100 μM . Elle a été isolée pour la première fois à partir de cellules musculaires par Straub en 1942. Le monomère d'actine (actine-G) est une protéine globulaire de 42 kDa, composée d'une unique chaîne polypeptidique de 375 acides aminés (figure 1.3, dessin d'après (Holmes et al., 1990) et (Kabsch et al., 1990)). Le monomère d'actine possède des sites de liaisons à l'ATP et à la myosine 2, moteur moléculaire permettant la contraction des bords cellulaire (cf. § 1.4).

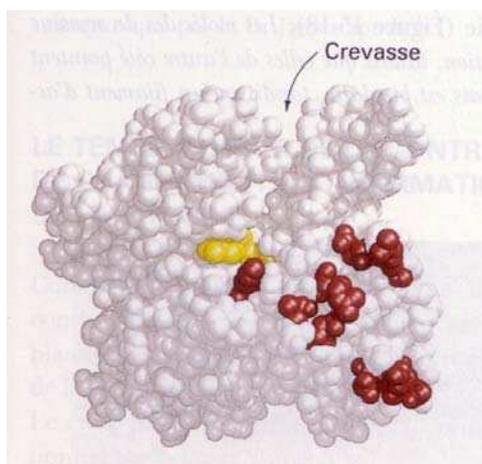


Fig 1.3 : Modèle compact de l'actine-G. l'ATP (jaune) est fixé dans une crevasse située entre deux domaines. Les résidus connus pour participer à la liaisons des têtes de myosine 2 sont représentés en rouge.

Chaque monomère d'actine possède à sa surface des sites de liaisons qui leur permettent de s'associer à d'autres monomères d'actine pour former un polymère qui aura la forme d'un long filament de plusieurs micromètres. Ce filament d'actine (actine-F) forme une double hélice, ou chaque monomère est en contact avec quatre autres (figure 1.4).

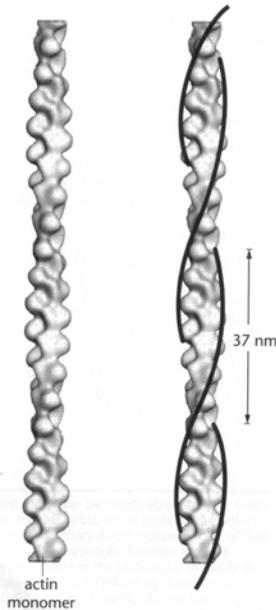


Fig 1.4 : *Structure d'un filament d'actine. Les monomères sont associés en double hélice à brins parallèles. Chaque monomère est en contact avec quatre autres (Bamburg et al., 1999).*

Le filament d'actine a une polarité unique due à l'orientation du monomère d'actine. On peut s'en rendre compte en observant les filaments d'actine s'associer avec les myosines. Nous parlerons de ce complexe actine-myosine plus tard dans le paragraphe 1.4. Les deux branches du filaments étant parallèles, les deux extrémités du filament d'actine ont une structure différente, puisque chaque extrémité expose une partie différente du monomère d'actine. Ainsi, les deux extrémités ne sont pas reconnues par les mêmes protéines et ont des propriétés de polymérisation très différentes. Cela définit donc deux extrémités sur un microfilament : l'extrémité pointée et l'extrémité barbée. La force de liaison entre les monomères d'actine dépend des paramètres physico-chimiques, comme le rapport entre la concentration d'actine-G et d'actine-F ou la force ionique.

L'actine-G liée à l'ATP commence à polymériser spontanément quand sa concentration dépasse $0,2 \mu\text{M}$. Le mécanisme de polymérisation se divise en deux étapes (figure 1.5).

- Un assemblage de monomères qui forme des trimères d'actine, à partir desquels les filaments grandissent rapidement.
- Addition successive de monomères d'actine aux extrémités barbées et pointées du filament d'actine.

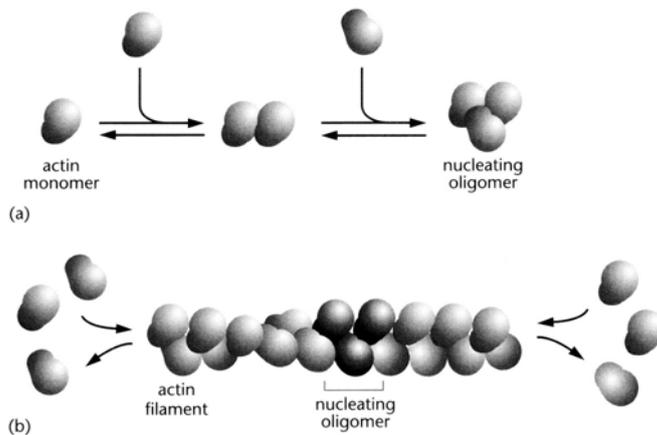


Fig 1.5 : Les deux étapes de la polymérisation d'actine. **(a)** La première étape, la plus lente, est la formation d'un trimère par nucléation de l'actine-G. **(b)** Une fois cet oligomère formé, les monomères s'associent successivement et forment un filament (Bray, *Cell movements*, p.68).

Une fois la polymérisation enclenchée, le processus peut être décrit comme l'association réversible de monomères d'actine sur un filament, avec un taux de croissance qui s'exprime de la façon suivante :

$$V = k_{on} \times [\text{actine} - G] - k_{off}$$

A la concentration critique k_{off}/k_{on} , la polymérisation est en équilibre avec la dépolymérisation.

Il a été montré, par observation au microscope électronique de filaments marqués, que les deux extrémités d'un filament d'actine ne grandissaient pas à la même vitesse. L'extrémité où la polymérisation est rapide est l'extrémité barbée, l'autre est l'extrémité pointée.

L'actine-G liée à l'ATP polymérise bien plus vite que l'actine G liée à l'ADP. En effet, les concentrations critiques valent respectivement 0,2 et 2 μM . De plus, les constantes d'association et de dissociation de l'actine liée à l'ATP sont : $k_{on} = 5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $k_{off} = 1 \text{s}^{-1}$, et pour l'actine liée à l'ADP, ces constantes valent respectivement 0,1 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et 0,2 s^{-1} . (figure 1.6). Il y a donc polymérisation préférentielle de l'actine G liée à l'ATP, et ce à l'extrémité barbée. Enfin, l'actine incorporée dans le filament d'actine hydrolyse rapidement l'ATP en ADP. La conséquence est que pour des concentrations d'actine-G comprises entre 0,2 et 2 μM , la croissance des filaments d'actine sera orientée dans une direction privilégiée : le filament polymérise à l'extrémité barbée et se dépolymérise à l'extrémité pointée. Dans ces conditions, il y a un mouvement des monomères de l'extrémité barbée vers l'extrémité pointée, et ce mouvement a été confirmé en ajoutant un monomère d'actine radioactif. Ce mouvement des monomères d'actine, d'une extrémité à l'autre, est appelé treadmilling (Pollard and Borisy, 2003).

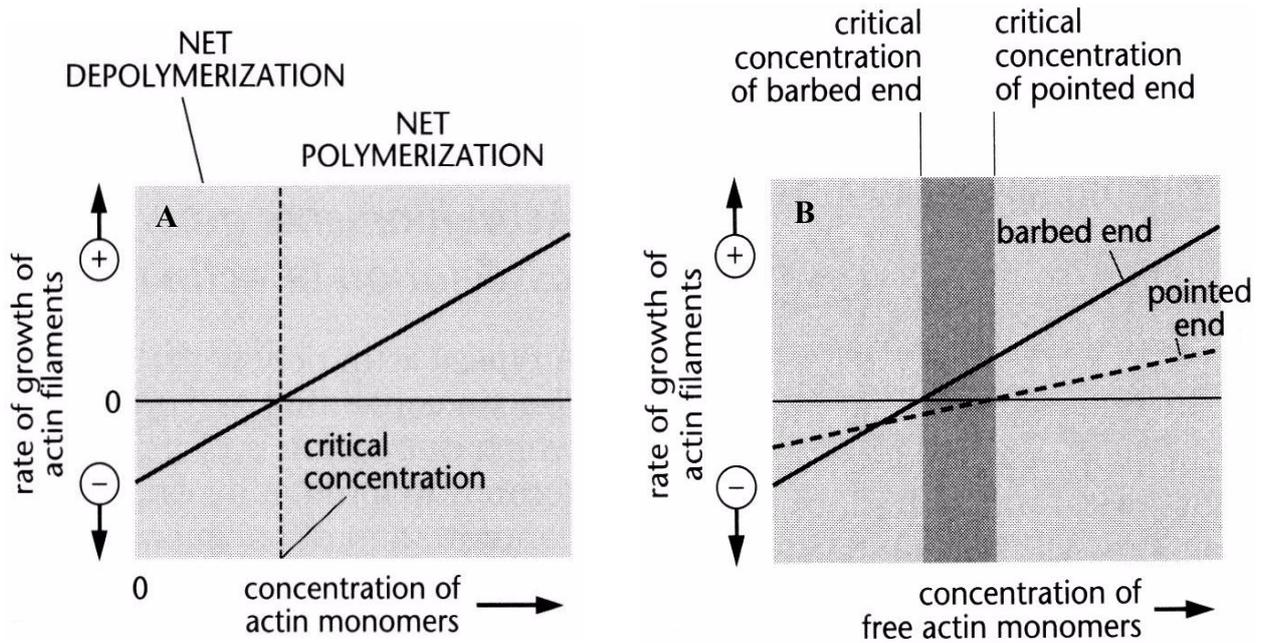


Fig 1.6 : **A.** Taux de croissance d'une extrémité des filaments d'actine en fonction de la concentration d'actine-G. **B.** Taux de croissance des filaments d'actine suivant l'extrémité et la concentration d'actine-G. Ce graphe montre que les monomères d'actine liés à l'ATP polymérisent plus vite que les monomères d'actine liés à l'ADP (Bray, *Cell movements*, p.68-69).

Le treadmilling et généralement la polymérisation de l'actine est possible grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Mais le rôle de l'ATP est longtemps resté incompris, car de l'actine-G lié à l'ADP est aussi capable de polymériser, bien que le treadmilling soit impossible lorsque tous les monomères d'actine sont sous forme ADP. Dans ce cas, le filament d'actine se comporte comme un polymère avec la même concentration critique à chaque extrémité.

De nombreuses protéines interagissent avec l'actine qui permettent soit d'améliorer la vitesse de polymérisation d'actine soit de structurer le réseau d'actine et le cytosquelette. En effet, la polymérisation de l'actine est 200 fois plus efficace dans les cellules que dans des solutions d'actine pure. On classe les protéines qui interagissent avec l'actine en plusieurs familles.

- Les protéines limitant la concentration d'actine-G libre : la thymosine β -4

Ce sont des protéines qui abaissent la concentration d'actine libre au voisinage de la concentration critique. Elles ont également une fonction de réservoir d'actine, grâce à la forte concentration de ces protéines de séquestration (0,5 M) et à leur faible affinité avec les monomères d'actine ($K_d = 0,7 \mu\text{M}$) (De La Cruz et al., 2000). Cette protéine a été isolée à partir du thymus de veau. Elle n'est pas présente chez *D. discoideum*.

- Protéines aidant la nucléation de filaments d'actine (complexe Arp2/3, formine)

Le complexe Arp2/3 est un ensemble stable de sept protéines dont deux sont apparentées à l'actine, Arp 2 et Arp 3. Il a été découvert en étudiant le cycle infectieux de la bactérie *Listeria*. On trouve ce complexe en grande concentration dans les cellules, et se trouve principalement au niveau du front avant, où l'actine polymérise. Le complexe coiffe la partie pointée des filaments et stabilise ainsi la croissance du filament d'actine du côté barbé. Il peut aussi se lier au côté des filaments d'actine en formant des branchements à 70°. Après la nucléation, le complexe reste lié à l'extrémité pointée du filament (Pollard and Beltzner, 2002). Mais le complexe Arp 2/3 seul favorise très peu la nucléation de nouveaux filaments d'actine. Cette activité est grandement accrue grâce à la famille de protéines WASP chez les eucaryotes. WASP est activée par Cdc42, une petite protéine G de la famille des Rho GTPases. Ainsi, WASP est le lien entre les signaux extracellulaires et la croissance des filaments d'actine (Rohatgi et al., 1999).

- Protéines liant l'actine-G et favorisant l'échange ATP/ADP : la profiline

Cette protéine, isolée pour la première fois dans les années 70 par Tilney à partir des cellules reproductrices du concombre de mer, facilite le transfert d'un monomère d'actine d'une thymosine vers l'extrémité barbée. La profiline possède un domaine de liaison au PIP₂ (phosphatidyl inositol bi-phosphate), un phospholipide présent dans la membrane plasmique. La liaison de la profiline à l'actine est inhibée en présence de PIP₂, et on pense qu'une des fonctions de la profiline est de contrôler la croissance des filaments d'actine au voisinage de la membrane plasmique (Schluter et al., 1997).

- Les protéines de fragmentation : la cofiline

Comme la profiline et la thymosine, la cofiline forme un complexe dimérique avec les monomères d'actine, pour un ratio de 1 :1. Mais elle se lie très fortement à l'actine-G, de telle sorte que la structure du monomère d'actine s'en trouve changée, ainsi que les propriétés de liaisons à d'autres monomères d'actine. La cofiline permet donc de couper les filaments d'actine. La cofiline est inhibée par phosphorylation par la kinase LIM qui est elle-même stimulée par une petite protéine G de type Rac. L'activation de la cofiline est due à une phosphatase (Bamburg et al., 1999).

La cofiline semble avoir pour rôle la stimulation de la dépolymérisation de l'actine à l'extrémité pointée du filament d'actine (Theriot, 1997). La profiline et la cofiline ont des rôles complémentaires dans le contrôle de la nucléation des filaments d'actine, alors que la thymosine offre une réserve de monomère d'actine. La cofiline est une protéine qui a d'abord été isolée dans les cellules des vertébrés.

- Les protéines de coiffe : la gelsoline

C'est une protéine qui est activée par le calcium et qui coiffe les filaments d'actine à l'extrémité barbée. Elle a aussi une activité de fragmentation des filaments d'actine. Cela permet localement de limiter la taille des filaments et globalement de densifier le cytosquelette d'actine grâce à l'apparition de nouveaux filaments d'actine. Il y a croissance de foyers multiples plutôt que d'un seul filament au détriment des autres. On trouve des concentrations importantes de gelsoline dans les zones où la dynamique du cytosquelette d'actine est intense, dans les protrusions par exemple (Condeelis, 1993).

- Les protéines de réticulation, dont les protéines d'assemblage parallèle

Ce sont des protéines qui permettent aux filaments d'actine de se lier entre eux, mais également à d'autres parties de la cellule, comme la membrane plasmique. Les filaments d'actine ainsi reliés sont plus rigides et peuvent donc exercer des forces plus grandes. Les « cross-linking proteins » permettent les branchements orthogonaux des réseaux d'actine, et les « bundling proteins » relient parallèlement les filaments d'actine.

La figure 1.7 récapitule le cycle de polymérisation de l'actine (Pollard et al., 2001; Pollard and Borisy, 2003)

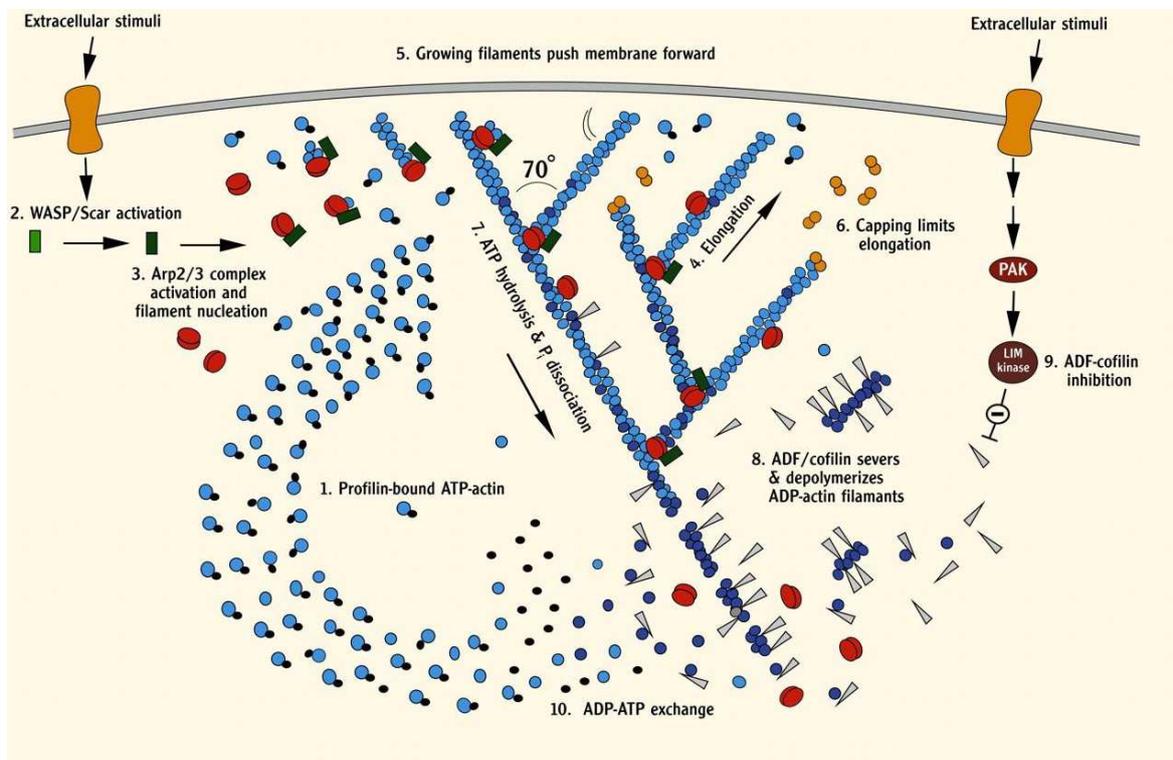


Fig 1.7 : Hypothèse de la nucléation de l'actine au niveau du front avant des cellules motiles. Cette figure montre le cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine, et la formation d'un réseau de filaments formant le cytosquelette (Pollard et al, 2001).

Il existe encore bien d'autres protéines qui peuvent se lier aux filaments d'actine, notamment les moteurs moléculaires que nous verrons au paragraphe 1.4. Le tableau 1.1 donne une liste des protéines présentes chez *D. discoideum* et les classe en différentes familles (Eichinger et al., 1999; Eichinger et al., 2005).

Monomer binding proteins	Profiline I à III, adenylyl cyclase-associated protein (CAP), Twinfiline-like, Actobindin-like, WH2-containing
Capping and severing proteins	Severine, cofiline (6 différentes), p32, p34, gelsoline, GRP 125
Capping and nucleation proteins	Arp 2/3, Scar, WASP, VASP, Formines
Cross-linking proteins	α -actinine, interaptine, fimbrine, fodrine, ABP 120 gelation factor, ABP 240, cortexilline I et II, protovilline, villidine, kelch, ABP 34, ABP 50, eEF1B
Membrane anchors	Taline A et B, comitine, interaptine, ponticuline, hisactophiline I à III, SLA-2-like, vinculine, annexine
Motor proteins	Myosines conventionnelles et non conventionnelles (13)

Tableau 1.1 : *Protéines de liaison à l'actine chez D. discoideum*

1.4 Les moteurs moléculaires et leur rôle dans les protrusions et rétractions cellulaires

La myosine 2 est un moteur moléculaire. C'est une protéine présente dans de nombreux types cellulaires, qui contrôle aussi bien la contraction musculaire que la rétraction des bords de cellules non musculaires. C'est une grosse protéine, d'environ 500 kDa, constituée de six chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes identiques de 200 kDa, chacune constituée d'une tête globulaire et d'une queue filamenteuse, et deux paires de chaînes légères de 20 kDa chacune (figure 1.8).. Les deux queues des chaînes lourdes d'une myosine 2 sont enroulées l'une autour de l'autre. Les têtes ont un domaine de liaison à l'actine et un site de liaison à

l'ATP. Les queues de plusieurs molécules de myosine peuvent s'associer et ainsi former des filaments multimoléculaires. Les chaînes légères, une essentielle et une régulatrice, sont associées aux têtes globulaires des chaînes lourdes (Ruppel et al., 1995; Ruppel and Spudich, 1995).

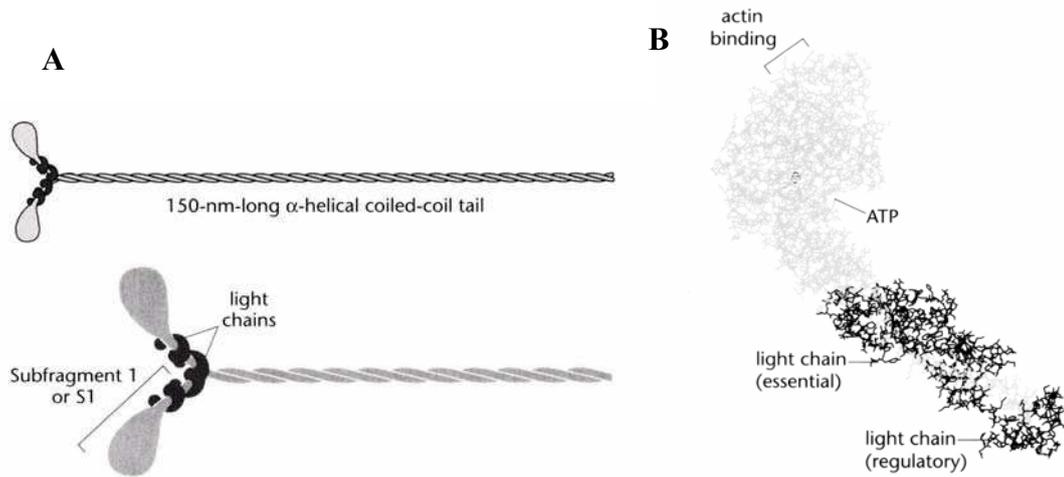


Fig 1.8 : **A.** Une molécule de myosine 2. **B.** Détail de la tête d'une molécule de myosine. Apparaissent les sites de liaisons à l'actine et à l'ATP et les deux chaînes légères (Bray, *Cell movements*, p. 104).

Les têtes de myosine 2 sont le siège de la transformation de l'énergie chimique en énergie mécanique, ceci grâce à une ATPase activée par la liaison avec l'actine, et dépendant des ions Mg^{2+} . Seules, les têtes de myosine 2 hydrolysent l'ATP très lentement, à un taux de deux molécules d'ATP par minute. Mais la liaison à un filament d'actine fait exploser ce taux, la tête de myosine étant maintenant capable d'hydrolyser 5 à 10 molécules d'ATP par seconde. Les chaînes légères stabilisent les queues hélicoïdales, et régulent l'activité des kinases permettant l'hydrolyse de l'ATP au niveau des têtes de myosine 2.

Nous allons maintenant voir comment la liaison de filaments de myosine aux filaments d'actine permet la génération de forces et la contraction des bords cellulaire.

Pour générer des forces dans le réseau d'actine, composé d'un très grand nombre de filaments, il faut que la myosine 2 forme également un large réseau filamenteux. La formation des agrégats bipolaires impose également que la molécule de myosine 2 soit activée par phosphorylation des chaînes légères par une enzyme, la myosin light chain kinase (MLCK), qui permet l'extension des queues de myosine. Les molécules de myosines 2 forment dans un premier temps des dimères, le site de liaison étant situé sur les queues de myosine. Puis ces dimères s'assemblent entre eux pour former des agrégats bipolaires (figure 1.9), grâce à l'activité des myosin heavy chain kinase (MHCK). C'est la phosphorylation des chaînes

lourdes qui induit le désassemblage des filaments de myosine 2, alors que leur déphosphorylation est une condition nécessaire à la formation des filaments. Il y a trois types de MHCK ayant chacune un rôle différent (De la Roche et al., 2002).

- MHCK-A : Régulation des agrégats bipolaires de myosine 2
- MHCK-B : Régulation de la concentration de filaments de myosine 2
- MHCK-C : Désassemblage des filaments de myosine 2 dans les zones de contraction

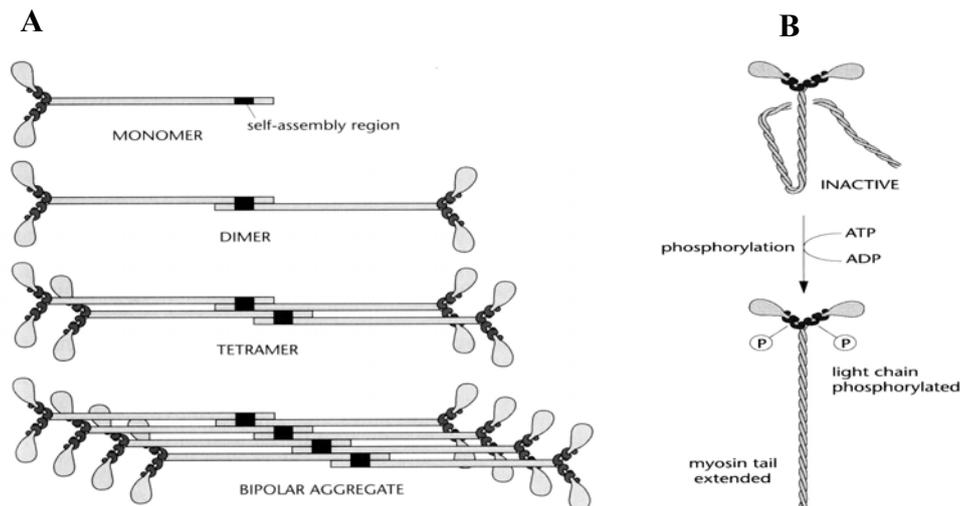


Fig 1.9 : *A. Agrégats bipolaires de molécules de myosine 2. B. La phosphorylation des chaînes légères de myosine 2 et la déphosphorylation des chaînes lourdes étend la queue d'une molécule de myosine 2 et permet l'agrégation (Bray, Cell movements, p. 107-108).*

Les têtes de myosines se lient aux filaments d'actine, et permettent la génération de forces et le glissement des filaments de myosine le long des filaments d'actine.

Lors du mouvement cellulaire, on trouve la myosine 2 dans les zones de rétractions. De plus, les cellules mutantes dépourvues de myosine 2 sont incapables de se rétracter (figure 1.10).

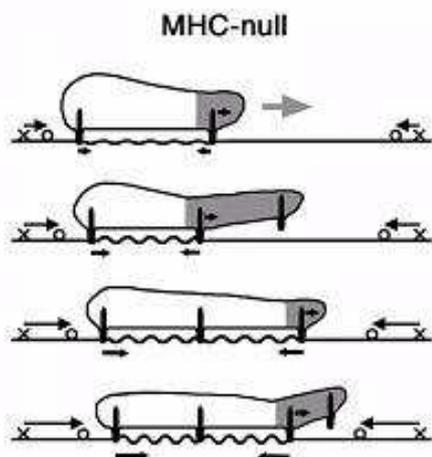


Fig 1.10 : *Modèle du cycle du mouvement cellulaire, pour des cellules D.discoideum dépourvues du gène codant pour la protéine myosine 2. En comparaison avec la figure 1.1, la cellule ne rétracte pas du tout l'arrière. (Uchida et al. 2003).*

Il existe également un nombre important de myosines dite non conventionnelles, qui ont des rôles et des structures différentes de la myosine 2. Alors que le rôle de la myosine 2 est exclusivement de produire des forces de contraction, les myosines non conventionnelles ont d'autres fonctions et sont impliquées dans la réticulation des filaments d'actine, la régulation des signaux de transduction, dans le trafic d'organelles d'ARNm, et bien d'autres encore. La famille des myosines non conventionnelles est très vaste, et on en dénombre actuellement plus de dix-huit (Berg et al., 2001). Nous présentons dans le tableau 1.2 une partie de la famille des myosines, ayant des éléments régulateurs, ainsi que leurs fonctions connues. Un des groupes les plus importants est celui des myosines 1 qui, chez *D. discoideum*, semblent être essentielles dans l'établissement et le maintien de la tension corticale, la motilité, l'endocytose et l'exocytose (Soldati, 2003). Certaines myosines non conventionnelles régulent la dynamique du turnover de l'actine dans les processus liés au trafic de membrane ou d'organelles. Elles sont nécessaires dans le contrôle des mouvements membranaires, on les retrouve donc dans les protrusions des cellules en mouvement. Ces myosines ont des différences structurelles, mais on retrouve ces trois composants qui sont la tête globulaire, la queue et les chaînes légères.

Classe	Nombre d'isoformes	Fonctions potentielles
1	19	Contrôlent les mouvements membranaires : phagocytose, formation de protrusions...
2	21	Forment des fins filaments et s'associent à l'actine pour générer des forces de contraction
3	?	Génèrent des tensions dans les cellules photoréceptrices
5	5	Transport d'organelles. Attachent les vésicules aux filaments d'actine
6	2	Stabilisent les cellules ciliées (audition). Permet le mouvement d'organelles
7	2	Renouvellement de membrane dans les cellules photoréceptrices
9	?	Différentiation des leucocytes, transduction du signal
<i>Dicty</i> MyoM	?	Régulatrices des GTPases de la famille des Rho. Contrôle de la dynamique de l'actine dans la phagocytose et la macropinocytose.

Tableau 1.2 : Différentes classes de myosines, conventionnelles ou non, et leurs fonctions

Chez *D. discoideum*, il y a 13 myosines réparties dans à priori 6 classes (Eichinger et al., 2005; Schwarz et al., 1999; Soldati et al., 1999):

- Myosine 1 : myoA, myoB, myoC, myoD, myoE, myoF, myoK
- Myosine 2 : mhcA
- Myosine 5 ou 11 : myoJ
- Myosine 7 : myoI, et une autre myosine 7
- Myosines non classifiées : myoM, myoH

1.5 L'adhérence cellulaire et la signalisation liée au contact cellule-substrat

On ne peut dissocier la migration cellulaire de l'adhésion sur le substrat. En général, les cellules n'entrent pas en contact de toute la membrane plasmique avec le substrat, mais en formant des points focaux d'adhésion (figure 1.11). Chaque point focal situé à quelques dizaines de nanomètres de la surface est relié à de nombreux filaments d'actine, reliés entre eux par des bundling proteins. Chez les eucaryotes supérieurs, ce sont les intégrines, des protéines transmembranaires, qui permettent l'ancrage des points focaux d'adhésion sur la matrice extracellulaire, et les filaments d'actine sont reliés aux points focaux d'adhésion grâce à plusieurs protéines comme la taline, la vinculine, la tensine. Ces points focaux d'adhésion sont importants dans la transmission des forces (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Par exemple, *D. discoideum* commence à émettre des rétractions uniquement si elle est étalée et adhérente sur un substrat, car la tension membranaire change.

Les points focaux d'adhésion sont construits autour des intégrines. Ces protéines transmembranaires sont composées de deux chaînes polypeptidiques, les α - et β -intégrines, qui font office de lien transmembranaire dans beaucoup de types cellulaires (Hynes, 1987). Un des domaines de la molécule d'intégrine est exposé à la surface de la cellule, et se lie à des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la vitronectine, qui permettent la liaison au substrat. A l'opposé, on trouve le domaine cytoplasmique de la molécule d'intégrine, associé à un nombre important de protéines, que nous détaillons dans la figure 1.11 et le tableau 1.3.

A

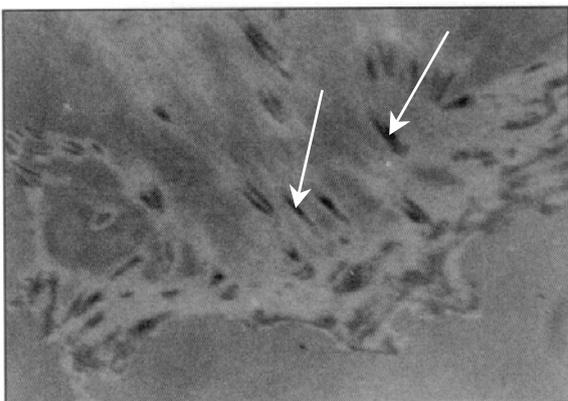
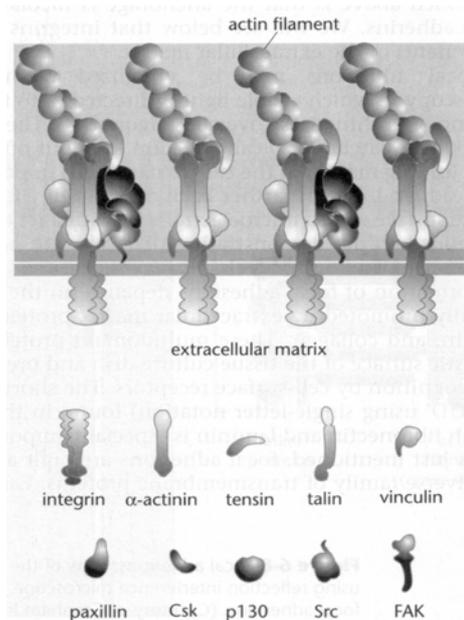


Fig 1.11 : **A.** Points focaux d'adhésion d'un fibroblaste (flèches) vus en RICM. **B.** Modèle spéculatif sur l'arrangement des protéines d'adhésion dans les points focaux d'adhésion.

B



Protéines	Homologue chez <i>D. discoideum</i>	Fonction
Actine	+	Composant structurel essentiel
Intégrines (α et β)	Complexes intégrines ?	Protéines membranaires, se lient aux molécules de la matrice extracellulaire
Taline	+	Se lie à la vinculine, à l'actine et aux intégrines
FAK	?	Tyrosine kinase, se lie aux intégrines
Tensine		Coiffent les filaments d'actine et les lient entre eux
Vinculine	+	Se lie à l' α -actinine et à la taline
α -actinine	+	Lient les filaments d'actine, se lie à la vinculine
Paxilline		Se lie à la vinculine et à FAK
Src		Tyrosine kinase
p130		Se lie à la tensine, substrat pour Src

Tableau 1.3 : Principales protéines des points focaux d'adhésion

Les cellules qui ont établi des points focaux d'adhésion utilisent l'information comme quoi elles sont bien attachées au substrat pour s'étaler, bouger ou se différencier. La force de l'attachement des points focaux sur la surface est modulée par la cellule, et lui permet de réguler sa vitesse de migration. Tout cela implique que les points focaux d'adhésion envoient et reçoivent des signaux de la cellule, via des protéines de phosphorylation, qui contrôlent le turnover des points focaux d'adhésion. En effet, on voit bien dans le tableau 1.2 que certaines protéines ont une fonction de signalisation plutôt que structurelle ou mécanique. Par exemple, FAK (focal adhesion kinase) et Scr phosphorylent les tyrosines dans plusieurs protéines des points focaux d'adhésion, y compris elles-mêmes, ce qui va permettre à nombre de protéines se liant aux tyrosines phosphorylées (FAK et Scr) de s'agréger dans les points focaux d'adhésion (Wozniak et al., 2004).

Les petites GTPases de type Rho ont également un rôle clef dans le contrôle de nombreuses associations entre l'actine et la membrane plasmique. Elles interagissent avec les kinases et contrôlent une grande variété de processus. Dans le cas des points focaux d'adhésion, on pense que l'activation de Rho va permettre la phosphorylation des chaînes légères de myosine et permettre la création d'un complexe actine-myosine induisant des contractions, et donc des variations de la tension membranaire. Or, ce sont les variations de la tension membranaire qui permettent l'apparition des points focaux d'adhésion, augmentant la tension membranaire. Dans ce mécanisme auto-entretenu, il existe une synergie entre la biochimie et les forces mécaniques (Riveline et al., 2001).

Chez *D. discoideum*, il est fort possible qu'il y ait des homologues de protéines d'adhésion comme les intégrines. Mais il existe un autre modèle expliquant la formation des points focaux d'adhésion chez *D. discoideum*. Des protéines membranaires agrègent au niveau de la surface de la membrane et font contact avec le substrat. Ces protéines membranaires permettent la nucléation de filaments d'actine. Ces filaments d'actine sont reliés au cytosquelette d'actine par des myosine 1, activées par une myosine kinase. C'est ce lien entre les points focaux d'adhésion et le cytosquelette d'actine qui permet la transmission des forces et induire la formation des pseudopodes (Gingell and Owens, 1992; Uchida and Yumura, 2004).

Les aires de contact ne sont pas les mêmes entre des cellules *D. discoideum* végétatives et en développement. Dans le premier cas, les aires de contact sont bien plus grandes, les points focaux d'adhésion plus nombreux (figure 1.12). la figure 1.12.B montre aussi que, bien que les zones de contact soient nécessaire à la cellule pour exercer des forces, elle peut émettre

des protrusions au dessus de la surface de contact, à plusieurs microns de distance des zones de contact (Weber et al., 1995).

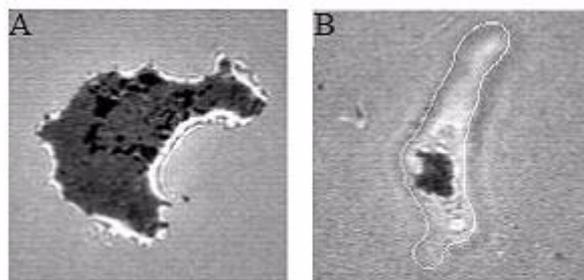


Fig 1.12 : Deux cellules *Dictyostelium sauvages AX2*, *A* est végétative, *B* est différenciée. Les zones de contact apparaissent en noir et sont obtenues par RICM. Les contours cellulaires, soulignés en blancs, sont visualisés par microscopie en fond clair (Weber et al. 1995).

Plus récemment, plusieurs protéines ont été caractérisées chez *D. discoideum* comme étant essentielles à la formation de zones de contact cellule-substrat.

Des cellules *D. discoideum* dépourvues de protéines Phg1, une protéine transmembranaire à 9 hélices, sont incapables d'adhérer sur certains types de surface, et présentent également des défauts dans la phagocytose (Benghezal et al., 2003; Cornillon et al., 2000).

Il a été montré également que des cellules *D. discoideum* mutantes ne synthétisant pas la taline adhèrent très peu au substrat (figure 1.13 (Niewohner et al., 1997)).

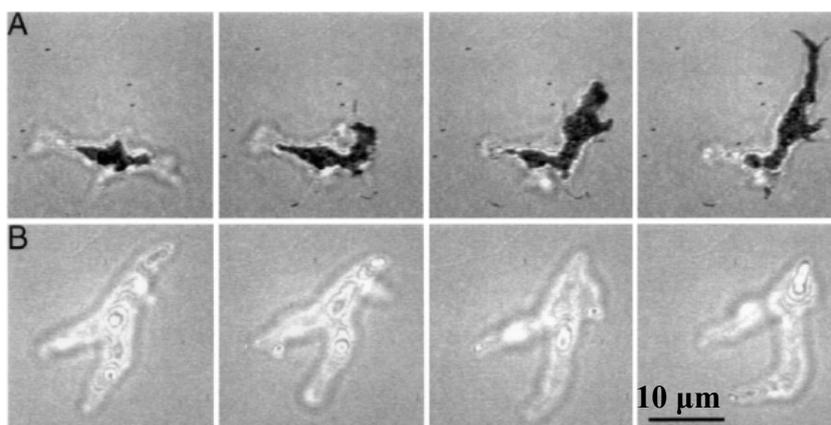


Fig 1.13 : Cellules *AX2* (*A*) et *Talin-null* (*B*) en développement, adhèrent sur une surface de verre. Les images sont obtenues en RICM et les zones de contact apparaissent en noir. On voit que les cellules *talin-null* ne forment pas de zones de contact (Niewohner et al. 1997).

Il existe d'autres protéines d'adhésion chez *D. discoideum*, qui interviennent dans le cycle de développement. DdCAD-1 et csA sont des protéines qui permettent les liaisons entre cellules lors de la phase d'agrégation. En effet, les cellules rentrent en contact grâce à des filopodes

riches en DdCAD-1, et une fois que les cellules sont en contact, csA est exprimée au niveau des points de contact (Coates and Harwood, 2001). La β -caténine quant à elle est une protéine également exprimée dans les jonctions intercellulaires pour des cellules *D. discoideum* en développement. Cette protéine est nécessaire à la formation de ces jonctions mais également à l'expression du gène permettant le développement des spores (Grimson et al., 2000).

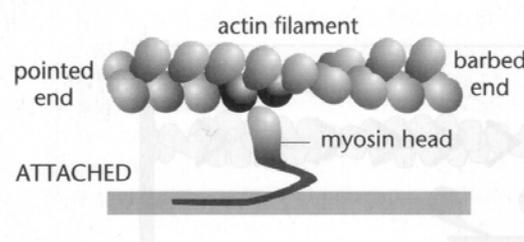
1.6 Les forces exercées par la cellule

Au niveau moléculaire, l'énergie d'hydrolyse de l'ATP peut être convertie en énergie mécanique dans deux types de structures : les réseaux d'actine filamenteuse et les complexes actine-myosine. Nous allons maintenant voir comment la polymérisation de l'actine exerce des forces de pression sur une surface comme la membrane plasmique.

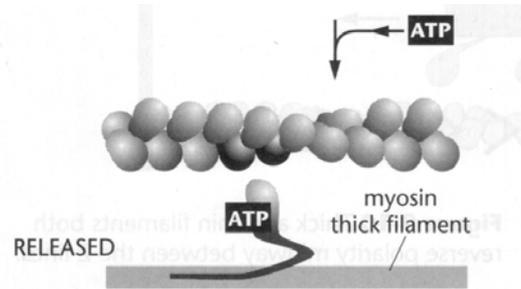
Une explication répandue fait intervenir le mouvement brownien. Le filament d'actine est vu comme un ressort qui vibre constamment à cause de l'énergie thermique. Quand le filament est courbé, il s'éloigne de la membrane plasmique et une unité d'actine-G s'associe au bout du filament. La force restituée quand le ressort se redresse contre la surface fournit l'énergie nécessaire pour pousser la membrane. C'est ainsi qu'en se polymérisant, le réseau d'actine exerce des forces contre la membrane permettant la formation des protrusions. La vitesse de croissance des protrusions est de l'ordre de 2 à 20 $\mu\text{m}/\text{min}$, suivant le type cellulaire et les conditions expérimentales. De telles vitesses signifient que le taux de croissance d'un filament d'actine du côté barbé correspond à 20-200 monomères d'actine liés par seconde, la taille d'un monomère d'actine étant de 1.5 nm (Carlier, 1998). Dans ce modèle, il est essentiel que les réseaux d'actine en train de polymériser soient ancrés du côté opposé à la membrane. Les mécanismes moléculaires ne sont pas connus, mais les cross-linking proteins et les moteurs moléculaires jouent certainement un rôle important.

Puisque la cellule émet de larges protrusions pour avancer, il lui faut donc rétracter le front opposé pour que toute la cellule puisse se mouvoir. Il se produit donc des contractions de la membrane, grâce à la myosine 2, qui s'assemble en un réseau structuré avec l'actine. Le mouvement des filaments de myosine 2 le long des filaments d'actine est dû à l'activité ATPase des têtes globulaires de myosine 2. le cycle a lieu comme suit :

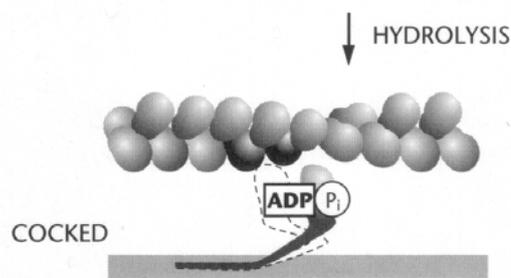
- La tête de myosine est liée au filament d'actine, au début du cycle de contraction.



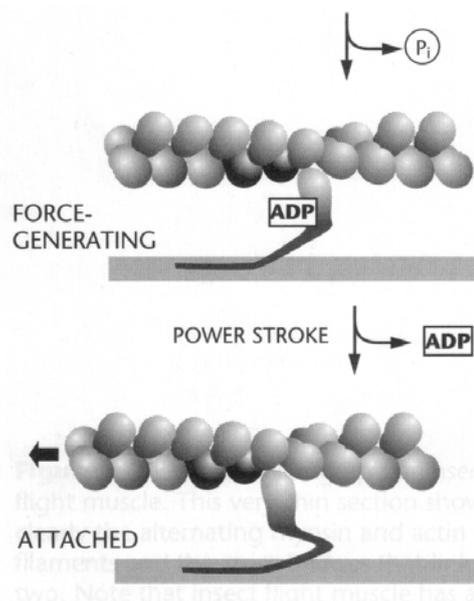
- La liaison d'une molécule d'ATP à la tête de myosine 2 induit son détachement du filament d'actine, grâce à un changement de configuration du site de liaison à l'actine, réduisant ainsi l'affinité de la tête à l'actine



- L'hydrolyse de l'ATP provoque un large changement de configuration de la tête de myosine 2, qui se déplace de 5 nm environ.



- La dissociation du phosphate inorganique, produit de l'hydrolyse de l'ATP, induit la liaison de la tête de myosine 2 au filament d'actine et est suivi d'un changement de conformation de la tête qui revient à son état initial, en générant la force qui va tirer le filament d'actine. Durant le retour à sa conformation d'origine, la tête perd son ADP, et un nouveau cycle peut commencer. La force exercée par une myosine est de l'ordre de quelques pN.



Les forces exercées lors des rétractions par le complexe actomyosine 2 font de l'ordre de 10 nanoNewtons chez *D. discoideum*, et la force nécessaire pour plier un pseudopode est de l'ordre de 1 à 2 nanoNewtons (Fukui et al., 2000). C'est bien l'association de l'actine et de la myosine 2 qui permet à la cellule d'exercer des forces de rétraction, puisque des cellules *D. discoideum* mutantes, dépourvues de myosine 2, sont incapables d'exercer des forces sur le substrat (Fukui, 2002).

1.7 Sensibilité des cellules aux forces

De nombreux types cellulaire sont sensibles à des forces mécaniques appliquées directement à leur membrane, ou bien indirectement en déformant le substrat sur lequel elles adhèrent. Nous disposons de plusieurs exemples dans la littérature, traitant de différents types cellulaires.

Si on applique une force mécanique qui déforme le substrat sur lequel adhèrent des kératocytes de poisson, cela va également déformer la membrane plasmique de la cellule, et en réponse à cette déformation, la cellule va se mouvoir dans le sens de l'application de la force (Lee et al., 1999). Le mouvement persiste tant que le fragment cellulaire énucléé est polarisé, même si on n'applique plus de force mécanique. C'est en fait la polarisation qui initie le mouvement (Verkhovsky et al., 1999).

Les cellules épithéliales, comme les cellules des vaisseaux sanguins, sont associées les une aux autres et s'orientent dans le même sens que l'application d'une force hydrodynamique de cisaillement. Cette force doit être appliquée de façon pulsatile et sur un temps très long (figure 1.14), car le mouvement à l'intérieur d'une structure multicellulaire est beaucoup plus long que le mouvement de cellules individuelles. A l'intérieur des cellules, les câbles d'actine forment des structures alignées dans le sens du flux (fibres de stress)

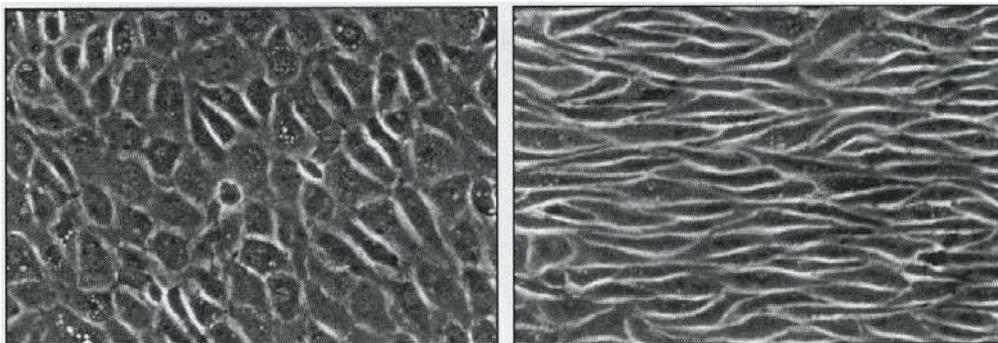


Fig 1.14 : **A.** Culture de cellules endothéliales provenant de vaisseaux sanguins bovins. Elles forment un tapis cellulaire confluent, mais leur orientation est isotrope. **B.** La même culture soumise à un flux de 2 Pa pendant 24 heures. Cette pression correspond au flux sanguin. Les cellules se sont alignées dans la direction du fluide (Malek and Izumo, 1996) .

Les fibroblastes réagissent également aux forces qui induisent des déformations de la membrane. La cellule adhérente émet une protrusion, qui s'ancre au substrat. La cellule utilise les nouveaux points d'adhésion pour se contracter et avancer, tout en détachant les points d'adhésion à l'arrière, et en contractant le bord cellulaire. Les fibroblastes ressentent les forces grâce aux fibres de stress, et leur répondent en créant de nouveaux points focaux d'adhésion dans le sens inverse de l'application de la force (figure 1.15 (Riveline et al., 2001)).

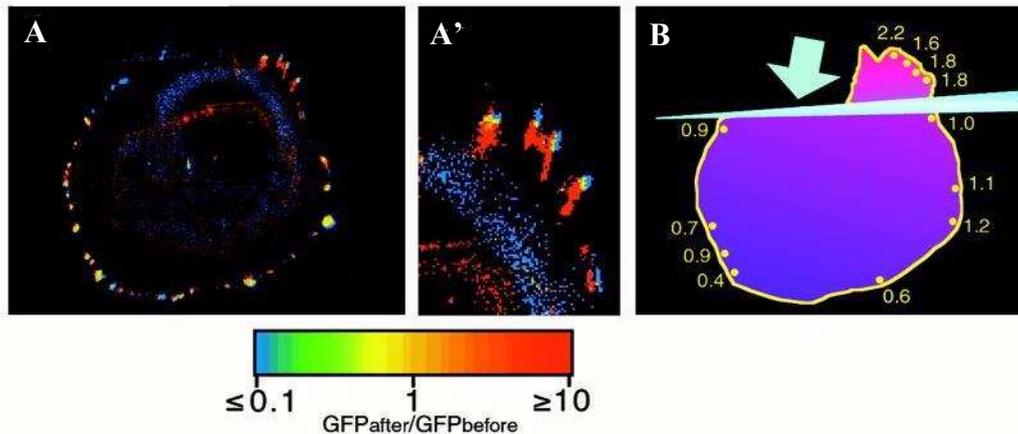


Fig 1.15 : *A et A'* : formation de points focaux d'adhésion en réponse à une force extérieure. L'apparition de points focaux s'accompagne d'un recrutement de vinculine, on utilise donc de la GFP-vinculine pour repérer les nouveaux points focaux (rouge), les anciens (bleu) et les stationnaires (jaune). *B* : Variation d'intensité des points focaux d'adhésion. En bleu la pipette qui permet l'application de la force et la flèche bleue représente la direction de la force. On voit que les plus importantes variations concernent les points focaux s'opposant à la force.

D'autre part, la sensibilité mécanique cellulaire est particulièrement importante dans certaines cellules spécialisées. Les cellules ciliées externes, qui jouent un rôle fondamental dans l'audition, sont des cellules spécialisées dans l'amplification du signal mécanique dans l'oreille interne (le son fait vibrer la membrane basilaire). Au sommet de chaque cellule, il y a des stéréocils associés en paquets et reliés entre eux par des petits liens mécaniques, les tip links, qui contrôlent l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques (figure 1.16 et 1.17). Suite à l'ouverture des canaux, le flux ionique va dépolariser la membrane et induire la contraction des cellules ciliées. Une myosine I contrôle la fermeture des canaux transmembranaires, permettant l'hyperpolarisation de la membrane et le retour de la configuration au repos des cellules ciliées. La contraction peut ensuite de nouveau avoir lieu. Il y a donc un mouvement des cellules ciliées externes à la fréquence du stimulus, ce qui amplifie le mouvement de la membrane basilaire (Strassmaier and Gillespie, 2002).

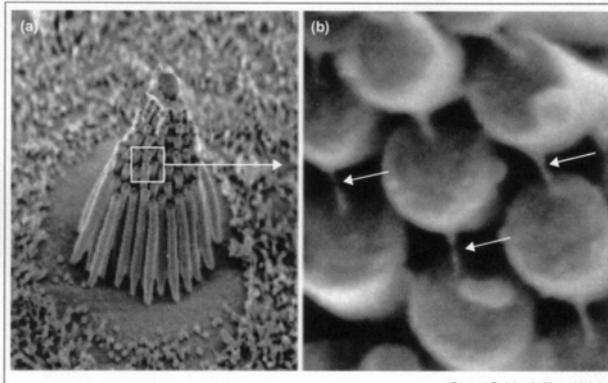


Fig 1.16 : (a) Paquet de stéréocils d'une cellule ciliée. (b) Ils sont reliés par des liens moléculaires (flèches) qui ouvrent et ferment les canaux ioniques (Strassmaier et al.).

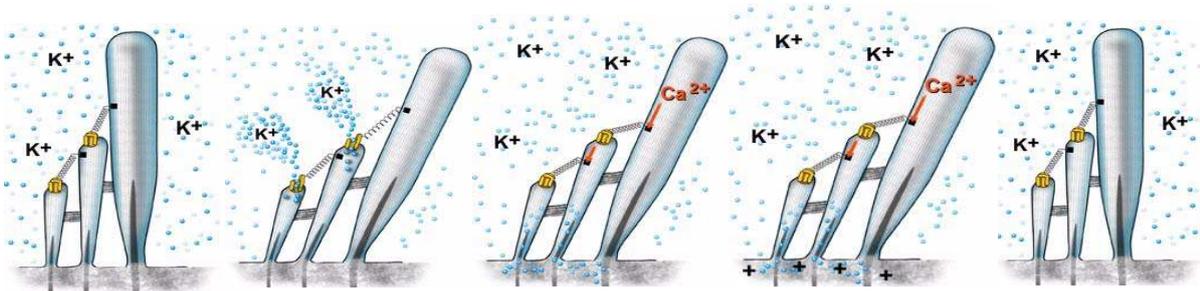


Fig 1.17 : la force mécanique déforme les stéréocils des cellules ciliées, ce qui étire les liens moléculaires et ouvre un canal transmembranaire qui laisse entrer des ions potassium dépolarisant la membrane. Une myosine I activée par le calcium permet de refermer les canaux arrêtant le flux ionique et hyperpolarise la membrane. Les cils reviennent ensuite à leur configuration initiale et le cycle recommence.

D. discoideum répond également aux stimulations mécaniques. Nous verrons dans le paragraphe suivant que, lorsqu'on applique un flux de cisaillement sur des cellules adhérentes sur plaque de verre, les cellules répondent à la force en migrant sur la surface.

Les mécanismes moléculaires de la transduction du signal mécanique en signal chimique sont peu connus. Il y a cependant plusieurs hypothèses.

- Présence de canaux mécanosensibles à travers la membrane plasmique, sur le même modèle que ceux empêchant le choc osmotique. Lorsque la pression osmotique devient trop forte et que le seuil acceptable de déformation de la membrane est atteint, les canaux mécanosensibles s'ouvrent et laisse passer un flux ionique pour rétablir l'équilibre des charges et diminuer la pression osmotique (Hamill and Martinac, 2001). Peut-être que chez *D. discoideum*, les forces d'étirement induisent une déformation de la membrane plasmique qui va ouvrir un canal mécanosensible à travers la membrane et permettre un flux ionique initiant une signalisation intracellulaire appropriée.

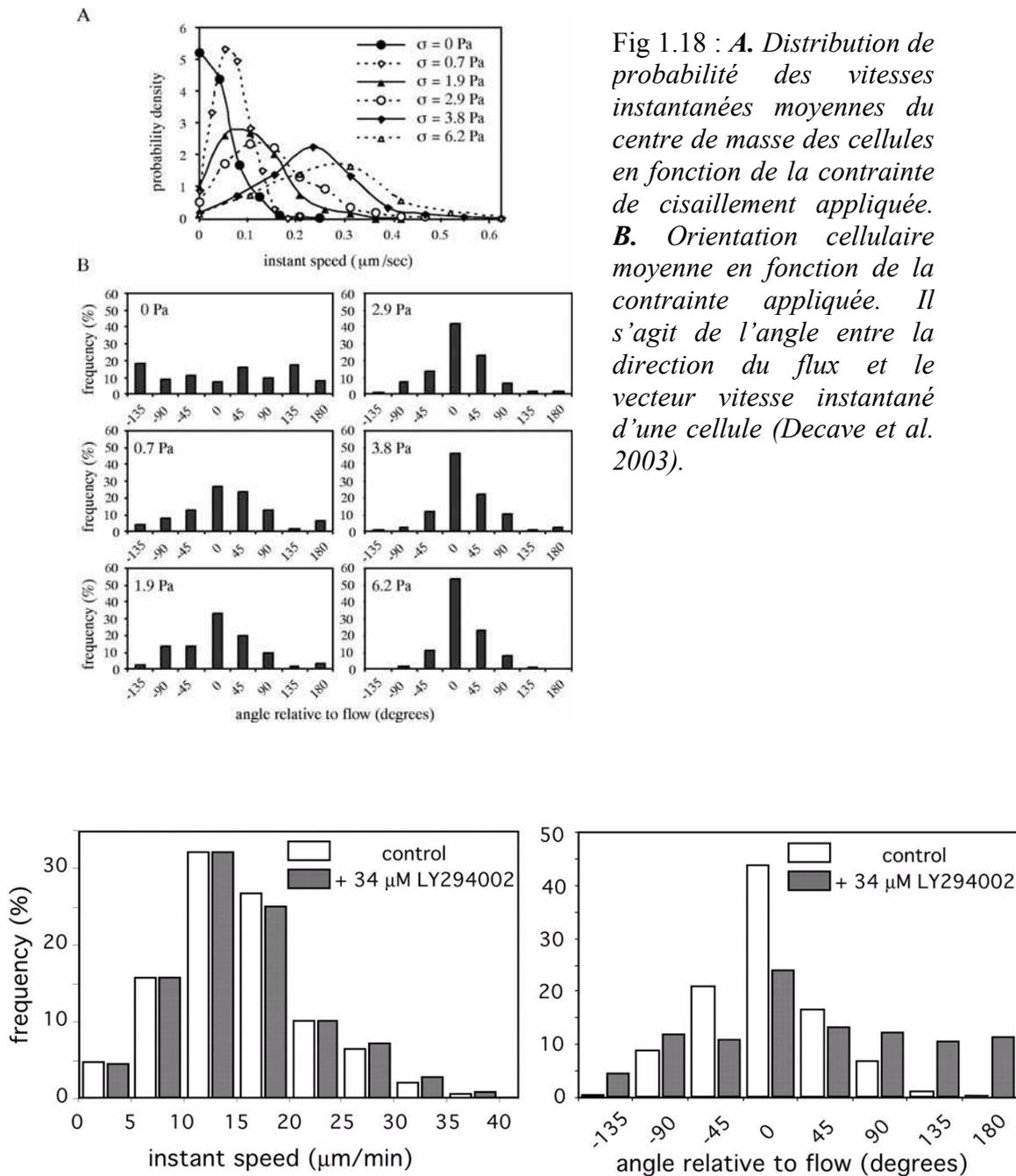
- Présence de « récepteurs » déformables, selon l'intensité de la pression exercée sur la membrane. Le changement de conformation extracellulaire du récepteur déclencherait une signalisation intracellulaire.
- La force appliquée tire sur la membrane plasmique, et cette force est transmise au cytosquelette d'actine via les points focaux d'adhésion, ce qui permettrait une polymérisation de l'actine dirigée dans le sens de la force. Des changements de conformation du cytosquelette induits par les forces de cisaillement permettraient la mécanotransduction. En effet, une dizaine protéines cytosoliques, la plupart présentes dans les points focaux d'adhésion (paxilline, vinculine, FAK, p130), voient leurs propriétés de liaison modifiées lorsque on applique des forces sur la membrane plasmique. En effet, déformer le cytosquelette induit la liaison de protéines formant les points focaux d'adhésion (Sawada and Sheetz, 2002).

1.8 Motilité induite par un flux de cisaillement chez *Dictyostelium discoideum*

Des cellules *D. discoideum* adhérentes sur un substrat de verre ont une motilité exploratoire intrinsèque. Le mouvement a une vitesse de l'ordre de 3 à 5 $\mu\text{m}/\text{min}$, et est isotrope. Les cellules se polarisent, parcourent 5-10 μm dans une direction puis changent d'orientation et repartent.

Lorsque on applique sur ces cellules un flux suffisamment faible pour ne pas les décoller, les cellules répondent à la stimulation mécanique en migrant sur le substrat dans le sens de la force appliquée. Plus la contrainte de cisaillement due au flux est importante, plus le mouvement des cellules est rapide et plus il est orienté (figure 1.18 (Decave et al., 2003)).

Il avait de plus été montré que cette motilité implique une signalisation intracellulaire. En effet, l'inhibition de la phosphatidyl inositol-3 kinase rend le mouvement totalement isotrope, alors que la vitesse demeure importante en réponse au flux hydrodynamique (figure 1.19).



1.9 Objectif du travail de thèse

Ce nouveau modèle expérimental est intéressant à plusieurs titres :

- Il permet d'étudier la signalisation intracellulaire responsable de la sensibilité mécanique
- Il permet de créer une motilité cellulaire dirigée sous contrôle d'un paramètre extérieur simple à faire varier (débit)
- Il est possible de réaliser des mutants d'invalidation chez *Dictyostelium discoideum* qui permettent de tester l'implication de protéines d'intérêt.

La motilité cellulaire de *D. discoideum*, sa sensibilité à des forces inférieures à celles qu'elle est capable de produire soulèvent plusieurs questions :

- Quelle est l'origine de la mécanotransduction chez *D. discoideum*, et quelles sont les voies de signalisation qui induisent une motilité cellulaire dirigée par un flux ?
- Quel est le lien entre l'adhérence cellule-substrat, la génération et la transmission des forces mécaniques induisant l'apparition des protrusions et des rétractions.

La stratégie employée a consisté, d'une part au niveau physique, à développer des outils de visualisation et d'analyse des zones de contact cellule-substrat, d'autre part au niveau cellulaire, à comparer le comportement de cellules sauvages et de mutants d'invalidation.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai étudié l'origine de la mécanotransduction en faisant varier la nature et la concentration des espèces chimiques en solution afin d'identifier les flux ioniques à travers la membrane plasmique mis en jeu lors du mouvement cellulaire. J'ai découvert que seul l'ion calcium Ca^{2+} avait une influence sur le mouvement et j'ai fait de nombreuses mesures de vitesse instantanée sur des cellules sauvages afin de comprendre l'influence de la concentration de calcium externe sur la vitesse, l'orientation des cellules, et la sensibilité des cellules aux forces appliquées. J'ai ensuite étudié des cellules mutantes, afin de comprendre les voies de signalisation, en particulier la signalisation calcique mise en jeu dans la motilité sous flux.

Dans la deuxième partie, je me suis demandé de quelle manière se faisait la motilité cellulaire, comment était contrôlée la vitesse des cellules. Pour cela, j'ai mis à profit les différentes manières de moduler la vitesse que j'avais mis en évidence dans la première partie.

J'ai donc étudié les changements de morphologie durant la motilité, en relation avec la vitesse cellulaire. Nous avons développé une nouvelle manière d'analyser la morphologie des protrusions et des rétractions, et mis en évidence un mouvement périodique des bords cellulaires. De cette étude j'ai conclu que la signalisation calcique stimule également les phénomènes de protrusion et de rétraction du bord cellulaire.

Pour aller plus loin dans la compréhension des phénomènes élémentaires au voisinage de la zone de contact, j'ai ensuite développé dans une troisième partie un nouveau dispositif expérimental permettant d'analyser quantitativement l'étalement cellulaire sur un substrat. Ces expériences montrent que les oscillations du bord cellulaire se produisent en l'absence de rétractions. Elles sont donc intrinsèquement liées aux mécanismes de polymérisation de l'actine induits par le contact.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Cultures cellulaires et préparation des cellules

Au laboratoire et dans les expériences liées à la motilité, à l'étalement et à l'adhésion cellulaire, les cellules *D. discoideum* sont utilisées en phase végétative, c'est à dire dans la phase unicellulaire. Il faut que le milieu environnant soit suffisamment riche en nourriture et en oxygène, sinon les cellules rentrent dans un cycle de différenciation et forment des agrégats.

2.1.1 Modes de cultures et milieu nutritif

La culture cellulaire est réalisée dans un milieu nutritif liquide (HL5, dont la composition est donnée dans le tableau 2.1) assurant l'apport en acides aminés, sucres, sels. Les souches cellulaires utilisées sont axéniques, c'est à dire qu'elles ont subi trois mutations leur permettant de se nourrir par pinocytose, alors que la souche d'origine ne peut se nourrir que par phagocytose. Un antibiotique est également utilisé afin d'éviter les contaminations du milieu de culture.

Nous utilisons deux modes de culture cellulaire :

- Cultures sur boîte de Pétri : les cellules adhèrent et se multiplient au fond de la boîte. La valeur du rapport Volume/Surface est de quelques millimètres ; ceci assure une bonne oxygénation des cellules aérobies. La concentration des cellules est contrôlée (10^6 cellules par mL de milieu) en diluant régulièrement les boîtes afin que les cellules restent non confluentes. Pour diluer les cellules, on les resuspend dans la boîte et on remplace les 9/10 de la suspension par du milieu frais.
- Cultures en suspension : on utilise des erlenmeyers que l'on remplit entre 1/15ème et 1/7ème du volume total. Le milieu de culture et les cellules sont placés sur un agitateur giratoire, et agités à environ 150 rotations par minute, afin d'oxygéner le milieu. On dilue régulièrement les cellules pour que la concentration soit comprise entre 10^6 et 5.10^6 cellules/mL.

Produits	Concentration massique (g/L)
Peptone	14,30
Extrait de levure	7,15
Maltose	18,00
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	1,28
KH ₂ PO ₄	0,48
Dihydrostreptomycine sulfate	0,25

Tableau 2.1 - *Composition du milieu nutritif HL5 pour la culture de Dictyostelium discoideum*

2.1.2 Types cellulaires

Le tableau 2.2 fait l'inventaire des types cellulaires utilisés, indiquant pour chacun la provenance, la lignée, la souche parentale lorsque il s'agit de mutants, ainsi que la façon dont ils ont été obtenus, et le phénotype.

Nom et provenance	Description	Mode de culture	Souche parentale	Méthode de mutagenèse	Phénotype
AX2 G. Gerisch	Souche axénique	Suspension			
AX2-Kay Dicty stock center	Souche axénique de R. Kay	Suspension			
HM1038 R. Kay	Mutant nul R-IP ₃ Δ	Suspension	AX2-Kay	Recombinaison homologue	petites fructifications. Résistantes à la blasticidine
DH1 Peter Devreotes	Uracile auxotrophe	Boîte	AX3	Recombinaison homologue	uracile-
PHG2 Pierre Cosson	Phg2Δ	Mutant nul boîte	DH1	Mutants d'insertion (REMI)	Résistantes à la blasticidine, défaut de phagocytose
LW6 P. Devreotes	Mutant nul Gβ nul	Boîte	DH1	Recombinaison homologue	agg- (défaut d'aggrégation), uracile+
LW20 P. Devreotes	Expression de Gβ dans LW6	Boîte	LW6	Insertion aléatoire	Résistante à la généticine
HS2205 Gunther Gerisch	Mutant nul Myo2nul	Boîte	AX2 G. Gerisch	Recombinaison homologue	Résistante à la blasticidine
S65T G. Gerisch	Myo2GFP dans Myo2nul	Boîte	AX2	Insertion aléatoire	Résistante à la blasticidine

Tableau 2.2 : *Différentes lignées de Dictyostelium discoideum utilisées pour les expériences*

2.1.3 Mesure de la concentration cellulaire

Pour mesurer la concentration cellulaire dans les boîtes ou les erlenmeyers, on utilise un compteur de particules (*Beckman Coulter Z2*). Cet appareil mesure non seulement le nombre de particules dans un volume de liquide donné, mais également détermine la distribution de tailles des particules comptées. La figure 2.1 montre une distribution de taille des cellules AX2. La distribution de tailles suit une loi log normale ne comportant qu'un seul pic. La distribution des tailles reste la même quelque soit la lignée de *D. discoideum* utilisée.

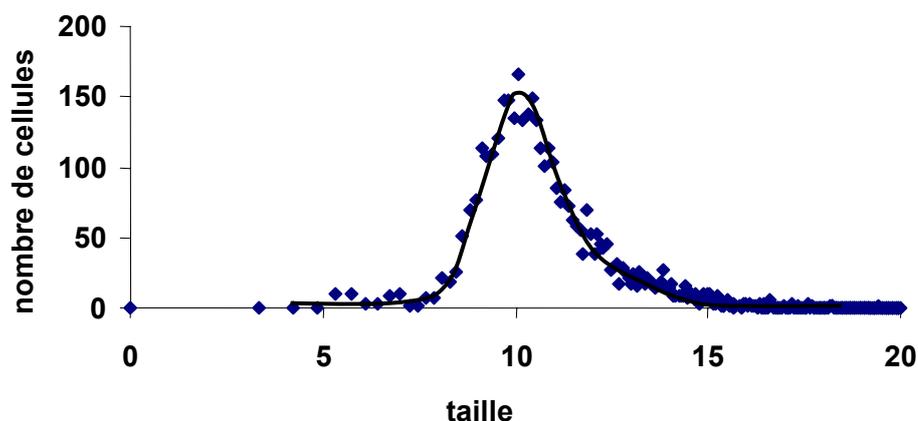


Fig 2.1 : cellules AX2 : distribution de tailles ajustée par une loi log normale

2.1.4 Préparation des cellules

Pour les expériences de motilité et d'étalement, les cellules sont resuspendues dans un milieu non nutritif incolore, le tampon de Sørensen (tampon SB, voir la composition sur le tableau 2.3).

On prélève des cellules en culture dans le milieu HL5, on les centrifuge (centrifugeuse *Beckman GPKR centrifuge*) pendant 3 minutes à 1000g. On les rince ensuite une fois avec le tampon SB puis on les centrifuge à nouveau 3 minutes à 1000g. On resuspend finalement le culot en tampon SB.

Produit	Concentration volumique (mM)
Na_2HPO_4	2
KH_2PO_4	14,5

Tableau 2.3 - Composition du tampon Sørensen, le pH final est 6,2

2.2 Traitement des surfaces

Le mouvement ou l'étalement cellulaire est étudié sur des surfaces de verre. Suivant les besoins, nous avons utilisé des lames porte objet (Esco, $75 \times 25 \text{ mm}^2$), des plaques de verre (Bio-Rad, $105 \times 85 \text{ mm}^2$) de 1 mm d'épaisseur, ou des lamelles couvre objet (Menzel-Glaser, $25 \times 60 \text{ mm}^2$) de $150 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

Les lames et lamelles sont initialement lavées avec un détergent, puis immergées dans une solution de soude à 14,5 M pendant 5 minutes, pour rendre le verre bien hydrophile. Elles sont ensuite soigneusement rincées, d'abord à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée, et on les laisse sécher à l'air libre.

2.3 Expériences de motilité sous flux. Détermination statistique de la vitesse et de l'orientation des cellules

Le but de ces expériences est d'étudier la vitesse et l'orientation instantanées moyennes des cellules soumises à un écoulement hydrodynamique appliquant une contrainte de cisaillement contrôlée. Les paramètres variables sont :

- Physico-chimiques : la contrainte hydrodynamique, la concentration d'espèces chimiques présentes dans le tampon, en particulier l'ion calcium.
- Biologiques : lignées cellulaires mutantes obtenues en supprimant ou en sur-exprimant certains gènes.

Nous allons d'abord détailler le dispositif expérimental, puis expliquer comment sont exploitées et traitées les données obtenues lors de ces expériences de motilité sous flux.

2.3.1 Chambre à flux latéral à lame

Cette chambre (Fig. 2.2) est composée d'un support en plexiglas, dans lequel est insérée une lame de verre, et d'un couvercle vissé par dessus. La distance e entre la lame et le couvercle est déterminée par un joint en téflon d'une épaisseur de $180 \mu\text{m}$. il y a également un joint en parafilm sous la lame, pour éviter les fuites. Les trous à chaque extrémité du couvercle permettent l'arrivée et l'évacuation du fluide. Le débit, symétrique dans la direction Ox , est contrôlé par la différence de hauteur du fluide, entre un réservoir supérieur et un réservoir inférieur.

Les cellules sont observées à travers la lame par un microscope inversé *Zeiss 415* équipé d'un objectif 2.5x, avec illumination en fond noir.

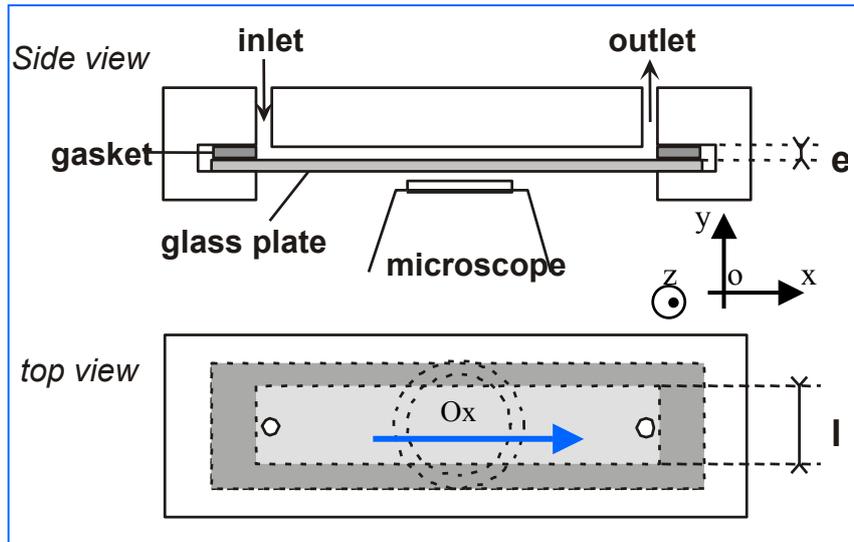


Fig. 2.2 – Représentation schématique de la chambre à flux latéral

Les cellules sont soumises à un écoulement latéral dont nous allons maintenant voir les propriétés.

2.3.2 Calcul de la contrainte appliquée au cellules

Pour déterminer les propriétés de l'écoulement, on remarque que la largeur l est très grande devant l'épaisseur e (voir la figure 2.2). On peut alors se ramener à un écoulement suivant x entre deux plaques planes, parallèles et infinies suivant Ox . Dans cette approximation, on a $\vec{v}(\vec{r}) = v(z)\vec{e}_x$, et l'équation de Navier Stokes se simplifie, en régime stationnaire, en

$$\eta \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} = \frac{dP}{dx}$$

avec les conditions aux limites $v(z = 0) = v(z = e) = 0$. La solution de l'équation est de la forme

$$v(z) = kz(e - z)$$

Le débit volumique vaut

$$D = \int_{-l/2}^{l/2} dy \int_0^e v(z) dz = \frac{k l e^3}{6}$$

d'où l'on tire la valeur de k . En reportant dans l'expression de v on obtient

$$v = \frac{6D}{le^3} z(e - z)$$

La contrainte exercée par les forces visqueuses sur la paroi est alors obtenue par

$$\sigma = \eta \left. \frac{\partial v}{\partial z} \right)_{z=0}$$

soit

$$\sigma = \frac{6D\eta}{le^2}$$

Expérimentalement, pour $D = 10$ mL/min, $e = 180$ μ m, et $l = 13$ mm, on a $\sigma = 2,4$ Pa

2.3.3 Préparation des cellules et déroulement de l'expérience

On remplit d'abord l'ensemble du dispositif en tampon SB, en prenant bien soin d'éliminer toutes les bulles d'air de la chambre et des tuyaux : une bulle d'air aurait pour effet de décoller les cellules sur son chemin. Ensuite, on coupe le flux et on injecte environ 1 mL de tampon SB contenant 10^6 cellules. On laisse les cellules sédimenter une minute, à contrainte nulle, puis on élimine les cellules non adhérentes avec un flux de faible débit (< 1 mL/min, $\sigma = 0,1$ Pa), pendant 3 minutes. Ensuite, on applique une contrainte déterminée, habituellement 2,4 pascals. Le débit est contrôlé par la hauteur des réservoirs amont et aval. Après avoir réglé la mise au point, on lance l'acquisition d'images pendant 10 à 15 minutes.

2.3.4 Changement de milieu, utilisation du calcium et détermination de la concentration

Dans certaines expériences, au lieu d'utiliser un seul récipient en amont, on peut en utiliser deux, le premier contenant le tampon SB, l'autre le tampon dans lequel on a rajouté la quantité de calcium désirée (ou éventuellement une autre espèce chimique, susceptible d'agir sur la cellule). On passe de l'écoulement d'un fluide à l'autre grâce à un système de tuyaux et de valves. Lorsque l'on fait des expériences à différentes concentrations de calcium, on laisse dans un premier temps les cellules adhérer en tampon SB, et on garde également le même fluide lors de la première minute du flux à faible débit. Ensuite, pendant les deux dernières minutes du flux faible, on change de réservoir pour celui contenant du calcium. Ensuite, on augmente le débit rapidement (en moins de 10 secondes), et donc la contrainte de cisaillement. La raison de cette procédure est que le calcium augmente grandement

l'adhérence entre les cellules, on s'assure donc que les cellules sont bien adhérentes au verre, avant de les mettre en présence de calcium.

Nous avons travaillé à des concentrations de calcium libre bien définies : sans calcium ajouté (5 μM), à 30, 100, 300, 600 et 1000 μM . On a également vu le comportement des cellules à très faible concentration de calcium libre, en rajoutant de l'EGTA dans le tampon. L'EGTA forme un complexe avec le calcium qui diminue la concentration de calcium libre dans le tampon. On mesure la concentration de calcium libre dans le tampon SB en ajoutant un fluorophore, le calcium green II. On relève la valeur de fluorescence que l'on compare à deux valeurs de base obtenues en ajoutant 1 mM de calcium ou 1 mM d'EGTA et on en déduit la concentration de calcium libre en ajustant les données avec cette équation :

$$\frac{F - F_{EGTA}}{F_{Ca} - F} = \frac{[Ca^{2+}]}{K_d}$$

où F est le niveau de fluorescence mesuré à la concentration $[Ca^{2+}]$ de calcium libre, F_{Ca} et F_{EGTA} les valeurs extrêmes mesurées (à 1 mM de calcium et à 1 mM d'EGTA), et K_d la constante de dissociation du calcium green II, qui est connue et vaut 0,55 μM .

2.3.5 Acquisition et traitement des images

Les mesures statistiques de motilité sous flux consistent en l'observation du comportement globale d'une trentaine de cellules adhérentes sur lame de verre, soumises à une contrainte hydrodynamique par un écoulement uniforme.

Le mouvement des cellules sur la plaque est enregistré par une caméra numérique (*SP-Eye Photonic Science*), et les images numériques sont stockées sur un ordinateur. Nous utilisons le logiciel d'acquisition et de traitement d'images *Image Pro Plus* (édité chez *Media Cybernetics*).

Les photos sont prises à intervalle de temps constant (toute les trente secondes pour une observation avec l'objectif 2,5x ; figure 2.3), et nous formons un film avec les images individuelles. Le mouvement d'ensemble des cellules apparaît alors nettement.

Nous analysons ensuite quantitativement ce film afin d'obtenir la vitesse et l'orientation instantanées moyennes de chaque cellule. Les cellules apparaissent comme des points blancs sur fond noir. La position des cellules est déterminée à chaque instant, en utilisant la fonction *count* dans *Image Pro Plus*. Le comptage est basé sur la segmentation des images : les pixels

de valeur inférieure à un seuil sont considérés comme le fond, et les pixels de valeur supérieure comme appartenant aux cellules. Afin que le seuil soit le même sur toute l'image, il est nécessaire de le rendre uniforme en appliquant la fonction *flatten background* (seuil de coupure de 20 pixels), un filtre passe haut qui supprime les variations d'intensité du fond. Le logiciel fait ainsi bien la différence entre les zones brillantes (les cellules) et les zones noires (le fond). Pour plus de précision, nous avons choisi de mesurer la position du centre de masse de chaque cellule à chaque image.

J'ai écrit deux macros dans le logiciel :

- Une procédure manuelle de suivi des cellules : quand on clique avec la souris sur une cellule que l'on veut étudier, une aire de travail circulaire d'un rayon de 7 pixels se dessine autour du pixel sélectionné, et le logiciel détermine la position du centre de masse de l'unique objet contenu à l'intérieur de cette aire. Il faut répéter cette procédure tout le long du film, c'est-à-dire suivre avec la souris la même cellule sur toutes les images. La différence de position d'une cellule entre deux images successives, en abscisse et en ordonnée, est stockée dans le *data collector* d'*Image Pro* puis dans un fichier excel, que nous exploiterons par la suite. On répète cette opération pour une trentaine de cellules.
- Une procédure de suivi automatique : cette macro est très semblable à la précédente, à la différence près que d'une image à la suivante la position du centre de l'aire de travail à t_{i+1} est reportée sur la position du centre de masse à t_i . Ainsi l'aire de travail se déplace automatiquement d'une image à l'autre en suivant une cellule sélectionnée. Cette procédure a l'avantage d'être bien plus rapide que la précédente, mais fonctionne mal quand les cellules sont très rapides. En effet, le programme les perd si l'aire de travail est trop petite, et si l'aire est trop grande, plusieurs cellules peuvent s'y trouver simultanément.

De plus, nous avons défini plusieurs critères pour le choix des cellules. 1) Elles doivent être uniformément réparties sur le film. Pour cela on dessine une grille, avant d'appliquer la macro, contenant trente cases, et on étudie une cellule par case. 2) On choisit des cellules qui ne rentrent pas en collision avec les autres, car on s'intéresse uniquement au mouvement de la cellule induit par la force hydrodynamique. 3) Enfin, il faut que les cellules restent adhérentes pendant au moins 5 minutes (10 images), car si la cellule se décolle trop vite, l'information renvoyée n'est plus seulement la vitesse de la cellule, mais aussi la vitesse de pelage.

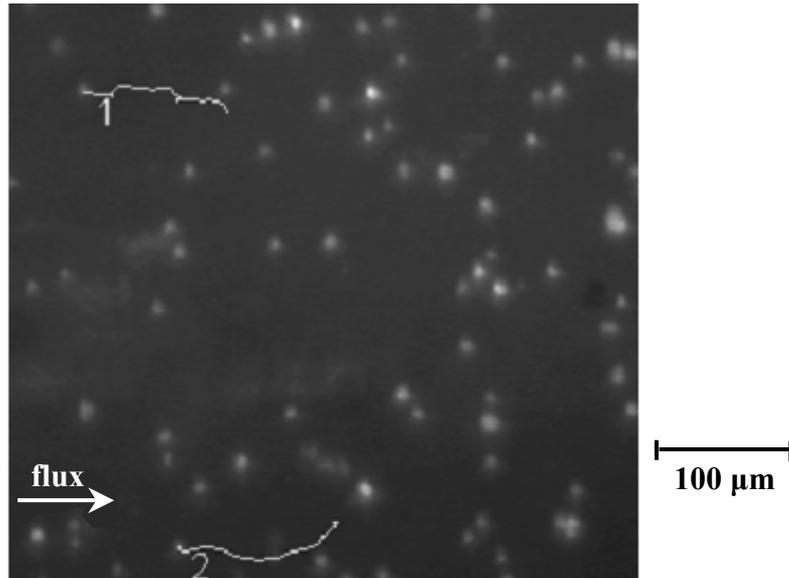


Fig 2.3 : Exemple de Trajectoire de cellules soumises à un flux, grossissement 2,5x, 10 minutes d'enregistrement

2.3.6 Traitement des données, champ de vitesse et orientation des cellules

Le fichier excel obtenu contient, à chaque instant t_i , le déplacement Δx et Δy de chaque cellule étudiée entre deux images. On calcule la norme du vecteur vitesse par la formule suivante

$$V_i = \frac{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}{\Delta t}$$

où Δt est le temps entre deux images. A un instant donné, on peut faire la moyenne $\langle v_i \rangle$ sur toutes les cellules analysées. Pour calibrer les distances sur le microscope, on a utilisé une cellule de Malassez.

On définit l'orientation d'une cellule entre deux images par le cosinus de l'angle d'orientation entre le vecteur vitesse et l'axe Ox, qui est la direction du flux

$$\cos\left(\arctan\left(\frac{\Delta y}{\Delta x}\right)\right)$$

Si l'angle est supérieur à $\pi/2$, les cellules vont dans le sens inverse de l'écoulement et le cosinus est négatif. Si l'angle est inférieur à $\pi/2$, les cellules vont dans le sens de l'écoulement, et le cosinus est positif.

A un instant donné, on peut déterminer l'orientation moyenne du vecteur vitesse $\langle \cos \theta_i \rangle$ de toutes les cellules analysées.

2.4 Expériences de motilité sous flux, analyse de la morphologie cellulaire et dynamique des zones de contact

En complément des mesures statistiques de motilité, nous avons voulu avoir des informations sur le comportement des bords de la cellule soumise à une contrainte hydrodynamique, c'est-à-dire étudier l'origine du mouvement cellulaire. Comme pour les expériences statistiques de motilité sous flux, nous avons étudié l'influence des espèces chimiques en solution et de la contrainte appliquée sur la morphologie cellulaire, sur la dynamique des zones de contact à l'avant et à l'arrière de la cellule (par rapport au sens du mouvement), et nous avons également fait une étude sur différents mutants, pour relier le mouvement de la cellule à la contrainte extérieure.

Nous détaillons dans ce qui suit les différents dispositifs expérimentaux, l'acquisition et l'exploitation des données obtenues lors de ces expériences.

2.4.1 Chambre à flux latéral à lamelle

Pour observer le bord cellulaire, nous utilisons un microscope *Olympus IX 71*, muni d'un objectif à immersion de grossissement 60x. Cet objectif nous impose de travailler avec une lamelle couvre-objet et non plus une lame de microscope, car sa focale est de 0,17 millimètres. Nous avons donc créé une nouvelle chambre, adaptée aux dimensions des lamelles couvre-objet. L'écoulement hydrodynamique reste donc le même, seules les dimensions changent. Cependant, les lamelles sont plus fines que les lames, et bien plus déformables ; il faut donc veiller à ne pas appliquer des gradients de pression trop forts, et arriver plus lentement au débit de liquide désiré.

2.4.2 Acquisition des images de cellules individuelles à fort grossissement

Les images sont prises par une caméra intensifiée (*Photonic Science*), contrôlée par le logiciel *Image Pro Plus (Media Cybernetics)*. Nous avons fait deux types d'observations :

- En illumination en contraste de phase : observation en lumière transmise de cellules individuelles. On voit le contour cellulaire et les organelles.
- En RICM (Reflection Interference Contrast Microscopy) : cette technique nous permet d'observer uniquement l'évolution de la surface de contact.

2.4.2.1 Illumination en contraste de phase

Afin d'observer les changements morphologiques rapides de la cellule, l'intervalle de temps entre chaque image est d'une seconde. La préparation des cellules, l'acquisition des images, est identique aux expériences de motilité sous flux à faible grossissement.

L'acquisition démarre une fois l'écoulement à débit élevé lancé, car en changeant le débit on change la pression exercée sur la lamelle, ce qui la courbe et change la mise au point qui est très sensible (il faut que les contours de la cellule soient nets et que les vésicules soient visibles, voir figure 2.4). Si on a besoin de changer de milieu, on s'assurera que le liquide ait exactement le même niveau dans les deux réservoirs en amont pour éviter une variation de la mise au point.

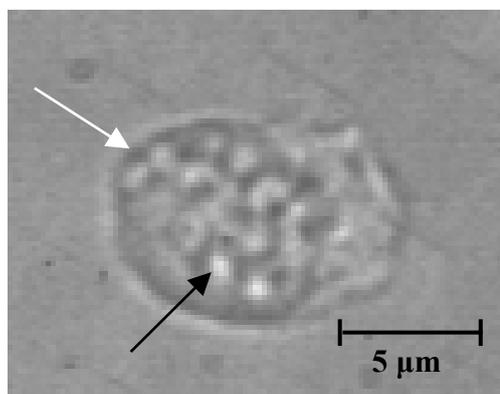


Fig 2.4 : une cellule observé au grossissement 60x, en contraste de phase : on distingue bien le contour cellulaire, les vésicules (flèches).

2.4.2.2 RICM

L'observation individuelle de la surface de contact cellule-substrat est réalisé en microscopie par réflexion à contraste interférentiel (RICM). Ce dispositif permet d'observer la surface de contact entre l'objet considéré et le substrat. Un schéma du montage optique est donné en figure 2.5.

On utilise la lumière d'une lampe à vapeur de mercure de longueur d'onde $\lambda = 550$ nm. Le faisceau est dirigé sur l'échantillon (figure 2.5A). Une partie du faisceau est réfléchié à l'interface avec le substrat, l'autre à l'interface avec l'objet à observer (figure 2.5B). La technique consiste alors à observer l'intensité lumineuse résultant de l'interférence entre ces deux rayons. Un dispositif anti-retour permet de s'affranchir autant que possible des

réflexions parasites sur l'optique qui affectent le contraste des interférences ; celui-ci est constitué d'un ensemble polariseur-analyseur croisés. A l'aide de ce dispositif, seuls les rayons participant aux interférences survivent, les rayons issus des réflexions parasites étant stoppés par l'analyseur. L'intensité I résultant des interférences des rayons d'intensité I_1 et I_2 (figure 2.5B) dépend de la différence de marche entre les rayons δ , donc de la distance h entre le substrat et l'objet à observer. La surface de contact avec le substrat apparaît alors en noir (figure 2.5C), à cause de la différence de marche de $\lambda/2$ induite par la réflexion du rayon I_1 , provenant d'un milieu incident de fort indice (verre) sur un milieu d'indice plus faible (eau). Lorsque la surface de l'objet s'éloigne du substrat, on doit observer une alternance de franges noires et de franges blanches caractéristiques du profil de l'objet (figure 2.5C), car ces franges sont d'égale épaisseur. En pratique, on observe facilement la première. On fait la mise au point à l'aide d'un diaphragme : les bords de ce dernier apparaissent nets quand le point focal est au niveau de la surface d'adhésion.

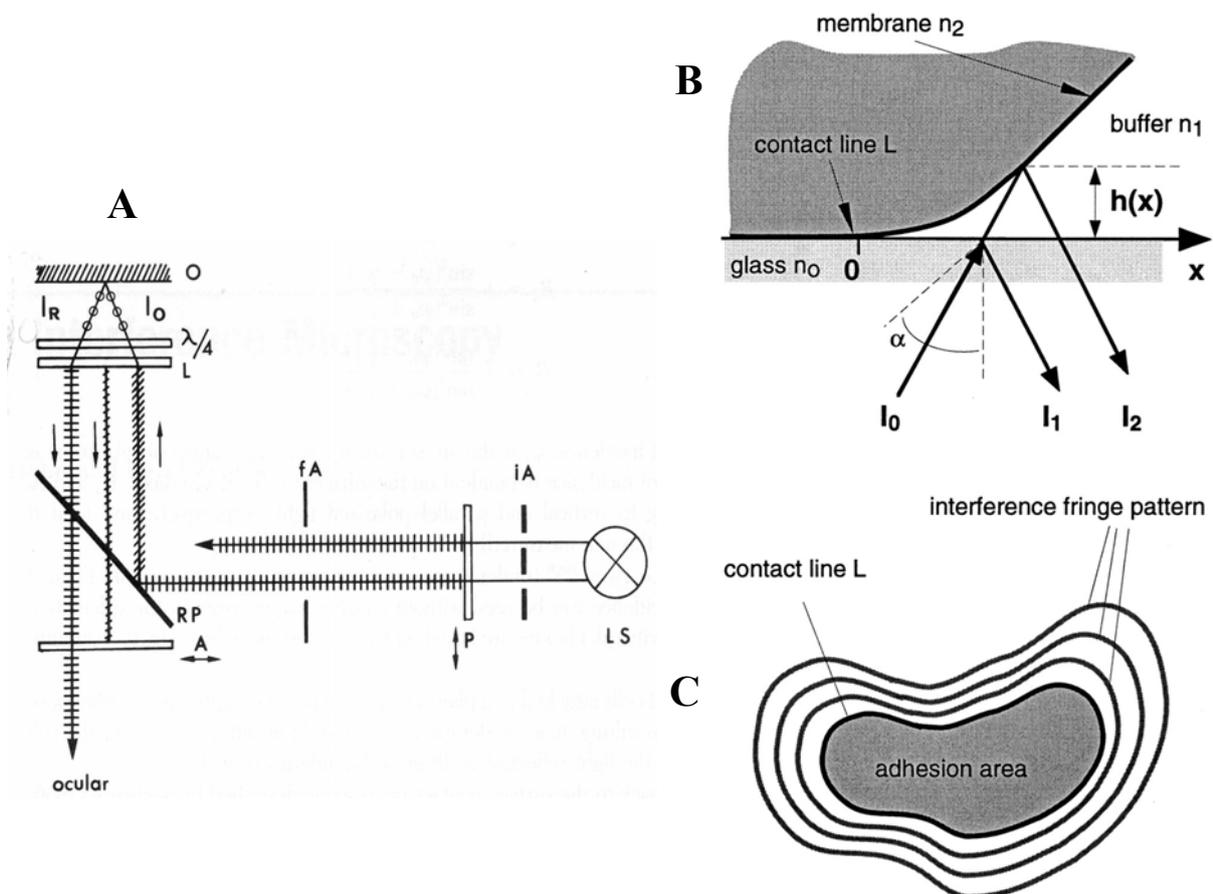


Fig 2.5 : A. Schéma du dispositif d'observation en RICM (Bereiter-Hahn et al., Cell Biology). B. Les interférences sont dues aux rayons réfléchis par le substrat et par la membrane de la cellule. La différence de marche entre ces rayons est relié au profil de la membrane $h(x)$. C. La surface de contact apparaît en noir, entourée de franges d'égale épaisseur (Simson et al., 1998).

2.4.3 Analyse des images RICM

Comme pour les expériences de flux latéral en illumination en contraste de phase, on prend des photos toutes les secondes et on les assemble en film pour observer la dynamique des zones de contact.

2.4.3.1 Extraction des contours des zones de contact cellule-substrat

Le contraste des images obtenues est amélioré par la procédure suivante :

- On soustrait d'abord une image du fond prise avant de déposer les cellules
- On ajuste le contraste et la luminosité de l'image, pour augmenter au maximum le contraste entre la zone sombre (zone de contact) et la zone claire (fond lumineux).
- On applique un filtre passe bas (seuil = 20 pixels) : cette fonction ramène au même niveau de luminosité les zones claires sur toute la durée du film
- Puis on segmente les images : les zones sombres deviennent blanches et les zones claires deviennent noires. C'est la fonction *count* qui nous permet de régler le seuil entre le fond et la zone de contact cellule-substrat, et ainsi détecter le bord cellulaire. J'ai automatisé cette procédure dans une macro.

Sur la figure 2.6, on voit des cellules sauvages avant (A et B) et après la segmentation (C et D).

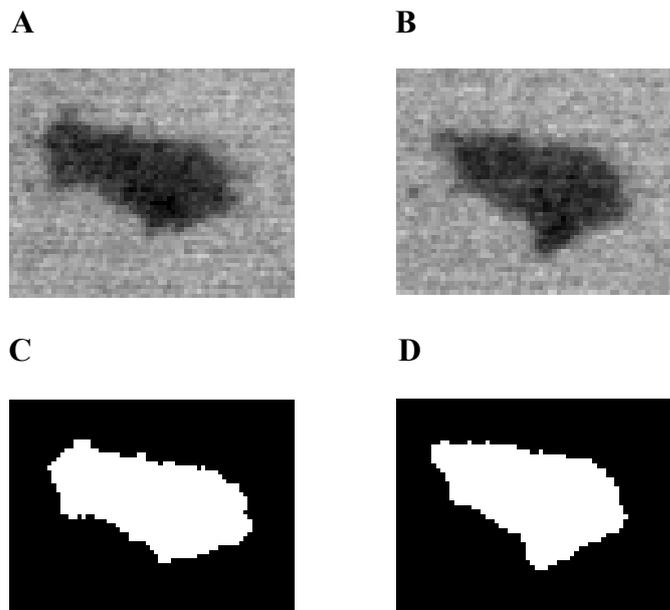


Fig 2.6 : A et B, images brutes de la même cellule AX2 à 10 secondes d'intervalle. C et D, images A et B segmentées

Une fois segmentée, l'évolution de la surface des zones de contact cellule-substrat en fonction du temps est analysée grâce à une nouvelle macro qui permet de définir les zones gagnées (protrusions) et les zones perdues (rétractions).

2.4.3.2 Mesure du taux d'aires gagnées et perdues au cours du mouvement

Sur les films segmentés, la surface de contact cellule-substrat représentée en blanc a une luminosité de 255 (valeur par pixel) et le fond noir une luminosité qui vaut 0. Les zones de gains ou de pertes de surfaces sont définies comme les aires où la luminosité augmente de 0 à 255, ou diminue de 255 à 0 respectivement entre deux images. Il y a également une partie invariante, où la luminosité reste constante. Mathématiquement, on définit ces différentes zones en utilisant l'équation suivante :

$$F_i = \frac{p_i - p_{i-3}}{6} + 127 + \frac{p_i}{255}$$

où p_i est la luminosité d'un pixel au temps t_i . Les aires gagnées, perdues et invariantes correspondent à $F_i = 170$, 86 ou 128 respectivement, et le fond à 127. On fait la différence entre i et $i-3$ pour éliminer les petites fluctuations, ce qui explique le terme $(p_i - p_{i-3})/6$, au lieu de $(p_i - p_{i-1})/2$. Le programme crée un fichier vidéo en trois couleurs : les aires gagnées, perdues et invariantes entre deux images sont respectivement bleues, rouges et vertes. Ce fichier nous permet de contrôler si un pic sur le graphe et l'apparition d'une aire colorée sur les bords cellulaires coïncident. La figure 2.7 nous montrent 5 images du film coloré espacées de 5 secondes : on distingue bien l'évolution de la surface des aires de contact. Elle correspond à la portion 0-20 secondes de la figure 2.8.

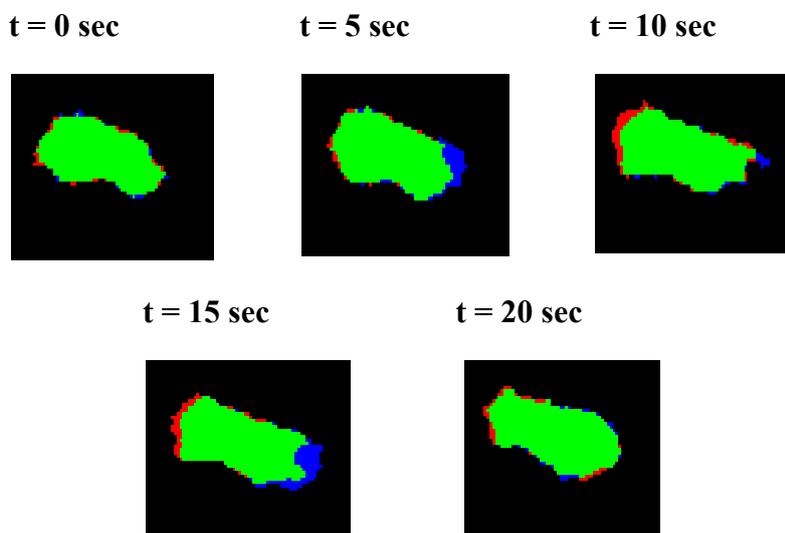


Fig 2.7 : cellule AX2 en mouvement : en bleu, l'aire gagnée, en rouge l'aire perdue et en vert la partie invariante. On voit des protrusions à 5 et 15 secondes, et des rétractions à 10 et 15 secondes.

Le programme calcule les gains et pertes en surface des bords cellulaires avant et arrière, entre deux images consécutives. On a donc accès à l'évolution de la surface gagnée (protrusions) ou perdue (rétractions) pendant le mouvement. La figure 2.8 nous montre un tel graphe : surface gagnée et perdue en fonction du temps.

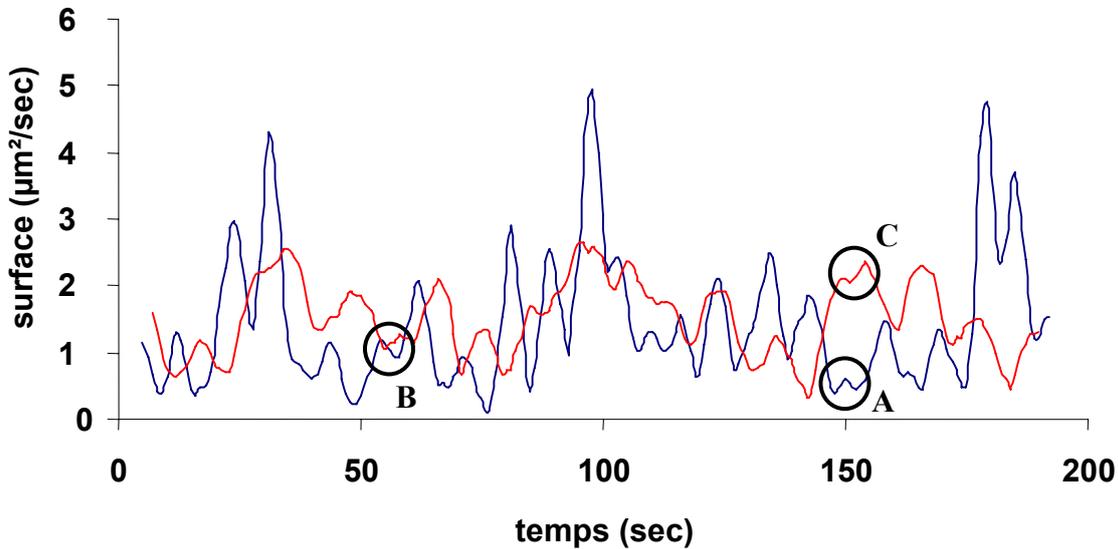


Fig 2.8 : courbes de gain (bleue) et de perte (rouge) de surface de contact des AX2 en mouvement en fonction du temps, lissées par un algorithme de Savitsky-Golay. On repère les protrusions et les rétractions comme les pics de la courbe de gain ou de perte. Les cas A, B et C correspondent à l'analyse des pics et sont à lire sur la courbe des gains (A et B) et pertes (C). Ces courbes correspondent à l'enregistrement complet de la cellule montrée sur la figure 2.7.

Pour éliminer le bruit dû à la segmentation, on applique deux filtres :

1) Le programme mesure la différence d'aire en moyennant sur 3 images :

$$\frac{\Delta A(i)_{i=3..n}}{\Delta t} = \frac{n_{px}(i) - n_{px}(i-3)}{t_i - t_{i-3}}$$

où $\Delta A(i)$ est l'aire gagnée ou perdue entre deux images, $n_{px}(i)$ le nombre de pixels gagnés ou perdus à l'image i . On effectue cette opération dans *Image Pro Plus*. On envoie ensuite les données vers un fichier excel et on trace les graphes de aires gagnées et perdues en fonction du temps.

2) Les courbes obtenues sont lissées par un algorithme de Savitsky-Golay. Comparé à l'algorithme de la moyenne flottante, l'algorithme de Savitsky-Golay conserve plus fidèlement la forme de la courbe, en attribuant des coefficients aux points moyennés. On a fait

une moyenne sur 7 points pour l'aire gagnée et sur 11 points pour l'aire perdue, où le bruit est plus important. Voici les formules utilisées :

$$S_7(i) = \frac{-2S(i-3) + 3S(i-2) + 6S(i-1) + 7S(i) + 6S(i+1) + 3S(i+2) - 2S(i+3)}{21}$$

$$S_{11}(i) = \frac{-4S(i-5) + S(i-4) + 5S(i-3) + 8S(i-2) + 9S(i-1) + 10S(i) + 9S(i+1) + 8S(i+2) + 5S(i+3) + S(i+4) - 4S(i+5)}{48}$$

2.4.3.3 Détermination de la taille et de la fréquence des protrusions et des rétractions

A partir des courbes de taux d'aires gagnées et perdues, un programme que j'ai réalisé sous excel permet d'extraire la position et la taille des extrema locaux (pics et vallées). L'analyse procède en trois temps :

1. On détecte la position et la valeur des extrema locaux et on les classe en maxima et minima locaux
2. On trie les données pertinentes :
 - Si la hauteur d'un maximum est inférieure à $2 \text{ px}^2/\text{sec}$ (soit $0,15 \text{ } \mu\text{m}^2/\text{sec}$), la valeur de l'incertitude de mesure, on néglige ce pic (cas A sur la figure 2.8).
 - Si un maximum est à moins de $2 \text{ px}^2/\text{sec}$ du minimum adjacent, alors on néglige ce pic (cas B de la figure 2.8).
 - Si deux pics consécutifs sont séparé par un minimum tel que la différence entre le minimum et un de ces pics est inférieure à $2 \text{ px}^2/\text{sec}$, alors on néglige le plus petit des deux pics (cas C de la figure 2.8).
3. On calcule finalement les histogrammes représentant les distributions des hauteurs et périodes (distance entre pics consécutifs) des pics.

2.5 Adhérence cellulaire

Nous allons décrire dans ce chapitre le dispositif expérimental de la chambre à flux radial (Decave et al., 2002). Les cellules en adhérence sur une plaque de verre sont soumises à un flux à géométrie radiale, permettant de mesurer le détachement en fonction de la contrainte appliquée, dans une fenêtre de contraintes fixée par le débit volumique de l'écoulement.

2.5.1 Chambre à flux radial, préparation des cellules et déroulement de l'expérience

Le dispositif expérimental est décrit sur la figure 2.9. Le substrat, une plaque de verre préparée suivant la méthode décrite dans le paragraphe 2.2, est déposé sur le support se trouvant dans le réservoir inférieur. Les cellules sont resuspendues dans du tampon SB et étalées régulièrement sur le substrat, à une densité d'environ 300 cellules par millimètre carré. Après un temps de sédimentation et d'adhérence de 10 minutes, la plaque est recouverte de tampon phosphate jusqu'au niveau des évacuations du réservoir inférieur, reliées à une trompe à eau, qui maintient constant le niveau de tampon dans le réservoir. Un disque en acier inoxydable de 80 mm de diamètre est ensuite posé délicatement sur le substrat. Le disque est percé en son centre d'un trou de 1,5 millimètre de diamètre. La distance e entre le substrat et le disque est fixée à l'aide de vis micrométriques ($0,20 \pm 0,01$ mm). L'orifice central du disque est relié par un tuyau à un réservoir supérieur contenant du tampon phosphate. L'écoulement est alors généré par gravité entre le réservoir supérieur et le réservoir inférieur. Une pompe péristaltique alimentée par un autre réservoir maintient le niveau de fluide constant dans le réservoir supérieur. De la sorte, le débit est constant. Le débit volumique est mesuré par le volume de fluide pompé pendant la durée de l'expérience. La symétrie radiale du dispositif d'injection de fluide sur le substrat a pour conséquence de générer un écoulement à symétrie radiale dont les propriétés sont étudiées dans le paragraphe qui suit.

2.5.2 Calcul de la contrainte appliquée aux cellules

Les cellules adhérentes subissent l'action des forces visqueuses exercées par le fluide dans l'écoulement (le nombre de Reynolds est très inférieur à 1, ce qui signifie que les forces d'inertie sont négligeable devant les forces visqueuses). On caractérise cette action mécanique par la contrainte à la paroi σ exercée par le fluide. Les cellules sont soumises ici à un écoulement à symétrie radiale. Cette géométrie simple va nous permettre de calculer σ . Soit r la distance entre le point considéré sur le substrat et la projection du centre du disque sur le substrat. L'équation de Navier-Stokes s'écrit :

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho \vec{v} \cdot \vec{\nabla} \vec{v} = -\vec{\nabla} p + \eta \Delta \vec{v}$$

la géométrie de l'écoulement étant radiale, le vecteur vitesse est dirigé suivant le vecteur radial \vec{e}_r , et ne dépend pas de la coordonnée orthoradiale θ . On a donc $\vec{v}(\vec{r}) = v(r, z)\vec{e}_r$, où z

désigne la coordonnée verticale. Par conséquent, on a $\vec{v} \cdot \vec{\nabla} \vec{v} = \vec{0}$. De plus, en régime stationnaire, $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = \vec{0}$. On suppose par ailleurs que $\vec{\nabla} p = \frac{\partial p}{\partial r} \vec{e}_r$. Les conditions aux limites d'adhérence du fluide à la paroi s'écrivent $v(r,0) = v(r,e) = 0$. Il reste

$$\eta \frac{\partial^2 v}{\partial z^2}(r, z) = \frac{dp}{dr}$$

Une solution de cette équation, compatible avec les conditions aux limites, est de la forme

$$v(r, z) = k(r)z(e - z)$$

La quantité expérimentalement accessible est le débit volumique de l'écoulement généré entre la plaque et le disque. Il faut donc relier le champ de vitesse au débit volumique D .

On a

$$D = \int_{\substack{\text{surface} \\ \text{latérale}}} \vec{v} \cdot d\vec{S}$$

En géométrie radiale, $d\vec{S} = 2\pi r dz \cdot \vec{e}_r$. On a donc

$$D = 2\pi r \int_0^e v(r, z) dz = 2\pi r k(r) \int_0^e z(e - z) dz$$

soit

$$D = \frac{\pi e^3 r k(r)}{3}$$

On en déduit l'expression de $k(r)$

$$k(r) = \frac{3D}{\pi r e^3}$$

On obtient finalement l'expression du champ de vitesse

$$v(r) = \frac{3D}{\pi r e^3} z(e - z)$$

La contrainte à la paroi est obtenue par

$$\sigma(r) = \eta \left. \frac{\partial v}{\partial z} \right)_{z=0}$$

ce qui donne

$$\sigma(r) = \frac{3D\eta}{\pi r e^2}$$

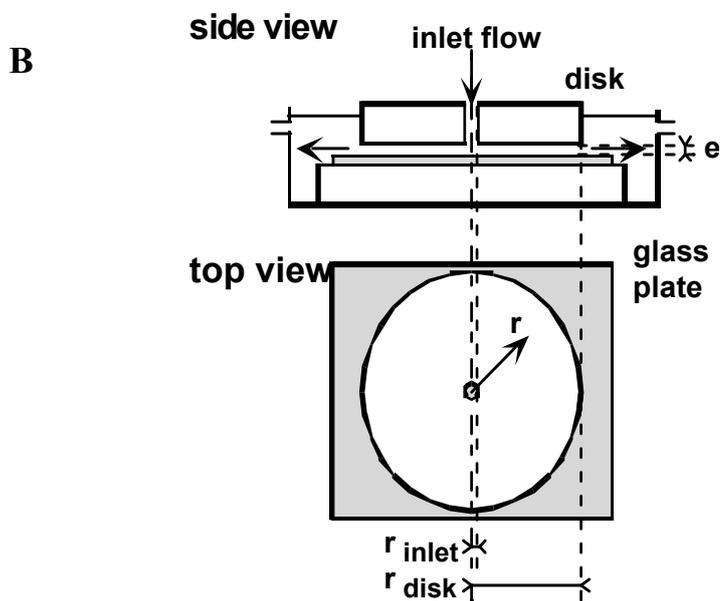
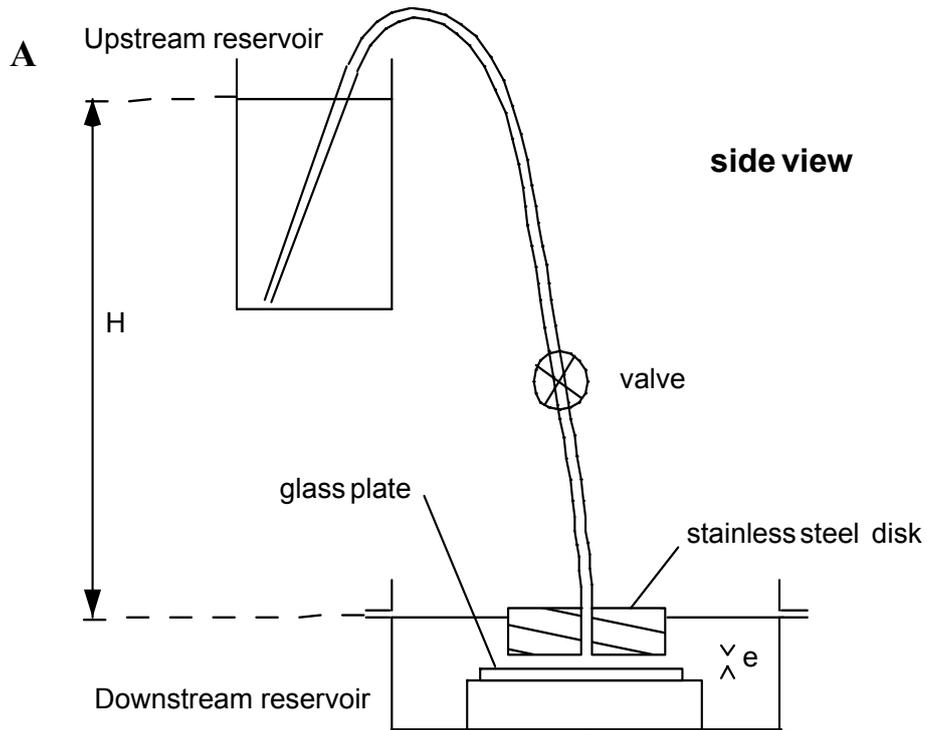


Fig 2.9 : A. Vue générale du dispositif expérimental de la chambre à flux radial. B. vue détaillée de la chambre d'écoulement.

Expérimentalement, $D = 45$ mL/min, et $e = 200$ micromètres. σ varie donc entre 0,45 Pa, à la limite extérieure du disque, et 20 Pa à $r = 0,75$ mm. La formule n'est plus valable pour des rayons plus petits.

2.5.3 Acquisition et traitement des images

Au bout d'un temps donné, on mesure la distribution des cellules restant en adhésion sur le substrat, en fonction de la distance au centre de l'écoulement, et donc de la contrainte appliquée.

Cette distribution est obtenue par observation microscopique en fond noir au grossissement 2,5 x. Une série de clichés (voir figure 2.10) est prise avec une caméra le long d'un axe Ox. Après association de ces images les unes à la suite des autres, on reconstitue une bande d'observation allant de l'origine 0 de l'écoulement à une distance $r = 20$ mm de celle-ci, de part et d'autre de l'origine. Des images sont également enregistrées à $r = 40$ mm et $r = 50$ mm (en dehors du disque) afin de mesurer le nombre initial de cellules (contrainte nulle). L'origine de l'écoulement est quant à elle repérée grâce au point de stagnation (voir par exemple sur la figure 2.10).

Ensuite, la densité des cellules restantes après l'écoulement est déterminée par comptage à l'aide du logiciel *Image Pro Plus*. On définit une fenêtre d'intérêt de dimension $0,6 \times 1,5$ mm² à une distance r du centre puis on égalise localement la luminosité du fond avec la fonction *flatten background*. Cela augmente d'une part le contraste entre le fond et les cellules et d'autre part efface les pollutions lumineuses dues à des réflexions. On réalise ensuite un seuillage avec la fonction *count*, en limitant l'aire minimale des objets que l'on veut étudier à 10 px². Il faut enfin corriger le comptage à cause de la présence d'agrégats de plusieurs cellules, qui sont comptés comme un seul objet. Pour cela, on détermine l'aire des objets uniques et on divise l'aire des agrégats par celle des objets uniques.

On fait de même pour les images prises en dehors du disque, ce qui donne la densité de cellules initiale, qui servira à normaliser les résultats. On calcule finalement le pourcentage de cellules restantes en fonction de r .

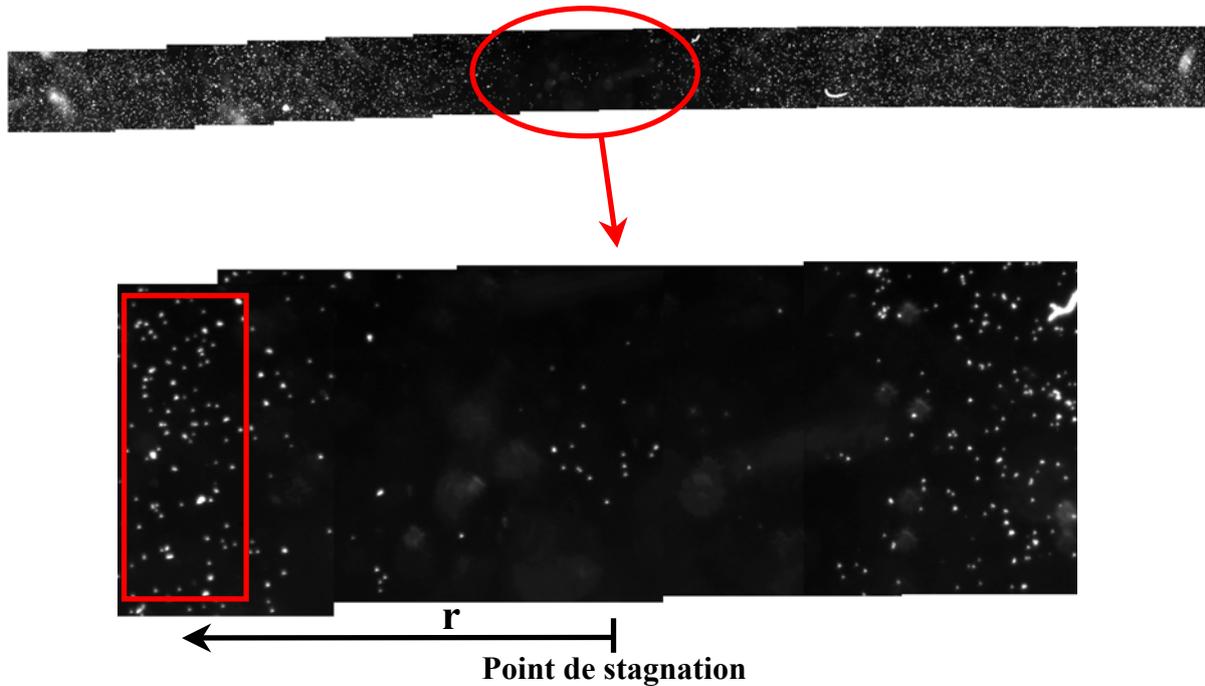


Fig 2.10 : Image reconstituée du substrat après une expérience de décollement, avec un exemple de point de stagnation, permettant de trouver le centre de l'écoulement. En rouge, la fenêtre de comptage que l'on déplace de proche en proche.

2.5.4 Détermination de la contrainte seuil apparente de détachement

La figure 2.11 nous montre un exemple de courbe de détachement cellulaire : pourcentage de cellules décollées en fonction de la distance au centre de l'écoulement r .

La contrainte seuil de détachement est la contrainte qui décolle la moitié des cellules sur le substrat. Par interpolation, on détermine à quelle distance $r_{50\%}$ du centre la densité des cellules qui restent est la moitié de la densité initiale. On obtient finalement la contrainte seuil de

détachement par la formule $\sigma_{50\%} = \frac{3D\eta}{\pi r_{50\%} e^2}$.

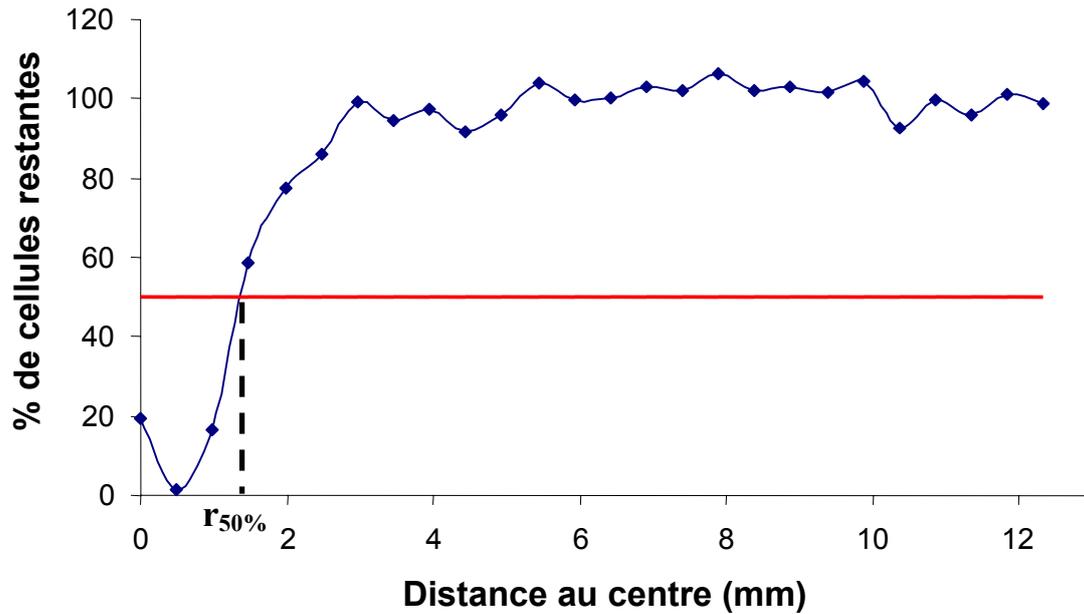


Fig 2.11 : pourcentage de cellules décollées en fonction de la distance au centre de l'écoulement. $r_{50\%}$ est la distance au centre à laquelle il reste la moitié des cellules.

2.6 Mesure de la cinétique de l'étalement cellulaire

Les expériences d'étalement cellulaire consistent en l'observation de la croissance des zones de contact, lors de la sédimentation des cellules sur une lamelle de verre.

2.6.1 Protocole expérimental

On prélève des cellules cultivées en milieu HL5, on les centrifuge 3 minutes à 1000xg, on les lave en tampon SB puis on centrifuge à nouveau pendant 3 minutes à 1000xg. Finalement, on resuspend le culot cellulaire dans du tampon SB à une concentration de 10^6 cellules par mL, et on place cette suspension en agitation. Les cellules sont gardées ainsi une heure au plus, car ce milieu étant non nutritif, les cellules commencent à se différencier.

Pour visualiser l'étalement cellulaire, nous utilisons des lamelles à 8 puits (*Lab-Tek, chambered coverglass system*). Chaque puits a une surface de 80 mm² et leur contenance est de 200 à 400 microlitres. On peut ainsi faire avec une lamelle 8 observations successives. Ces observations se font avec l'objectif à immersion 60x de l'Olympus IX 71, en RICM, mis au point sur la lame pour visualiser l'évolution de la surface de contact cellule-substrat.

On dépose 300 μL de la suspension de cellules dans un des puits, et on lance l'enregistrement par la caméra numérique commandée par l'ordinateur via le logiciel *Image Pro Plus*.

2.6.2 Acquisition et traitement des images

On prend une photo toute les 3 secondes, l'expérience dure environ 5 minutes. On prend également une image du fond que l'on soustraira aux autres pour améliorer le contraste. La figure 2.12 montre une cellule en train de sédimenter : la surface de contact augmente en fonction du temps.

On détermine les contours de la zone de contact cellule-substrat comme décrit précédemment, dans le paragraphe 2.4. On choisit des cellules qui n'entrent pas en contact avec les autres pendant la durée de l'expérience. Une macro que j'ai écrite détermine l'aire de la zone de contact pour chaque image, et envoie ces données dans un fichier excel. Nous obtenons ainsi les courbes d'évolution des aires de contact cellule-substrat lors de l'étalement cellulaire en fonction du temps.

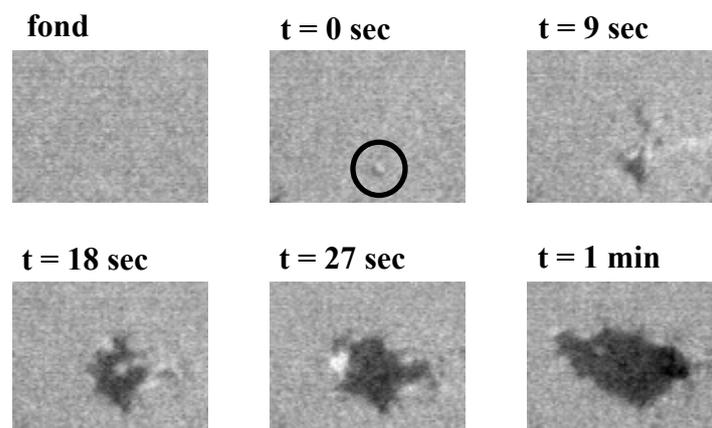


Fig 2.12 : *sédimentation d'une cellule AX2 en fonction du temps. L'origine des temps est définie lorsque apparaît le premier contact cellule-substrat (zone entourée sur l'image 2).*

2.6.3 Analyse de la surface de contact cellule-substrat

Comme pour les expériences de motilité sous flux en RICM (§ 2.4.3), nous avons analysé les aires gagnées et perdues par la cellule au cours de l'étalement cellulaire. Nous aurons ainsi, en plus de l'évolution de l'aire de contact cellule-substrat totale en fonction du temps, la localisation des aires gagnées et perdues entre deux images, tout au long du film. Cela nous a

également permis d'étudier la périodicité des protrusions et des rétractions lors de l'étalement cellulaire.

L'extraction des contours, la segmentation du film, la détermination des zones gagnées et perdues, l'analyse et les critères de sélection des pics sont les mêmes que pour les expériences de motilité sous flux en RICM et sont expliqués dans le paragraphe 2.4.3. Nous n'avons pas utilisé dans les expériences d'étalement, l'algorithme de lissage de Savitsky-Golay, car le temps entre chaque image est de trois secondes, et non plus d'une seconde comme dans les expériences de mesure des taux d'expansion et de rétraction de cellules sous flux. Il y a donc relativement peu de bruit lié aux fluctuations de surface des zones de contact.

3 PARTIE I : Vitesse et orientation des cellules sous contrainte hydrodynamique

Dans cette partie nous allons étudier l'effet d'une contrainte hydrodynamique sur les vitesses et orientations moyennes instantanées des cellules et présenter les résultats que nous avons obtenus sur le rôle du calcium extra et intra cellulaire dans le mouvement cellulaire. Ces expériences sont conduites dans une chambre à flux latéral, sur lame, les cellules étant observées à faible grossissement (2,5x).

3.1 Effet de la concentration de calcium externe sur les cellules sauvages AX2

On va d'abord étudier la réponse induite par un flux des cellules *D. discoideum* en faisant varier la concentration de calcium libre dans le tampon SB. On fera ensuite varier la contrainte de cisaillement en faisant varier le débit de fluide : on travaillera dans une fourchette de contrainte allant de 0,1 Pa à 3,5 Pa. Nous verrons que le calcium influe sur la sensibilité des cellules aux forces.

3.1.1 Réponse des cellules à une force appliquée

Les cellules sauvages adhérentes sur une lame de verre immergé en tampon SB ont un mouvement intrinsèque à faible vitesse, inférieure à 5 $\mu\text{m}/\text{min}$ en moyenne, et isotrope : le cosinus moyen est nul (voir la figure 3.1). Mais si on applique une contrainte hydrodynamique, alors la vitesse des cellules va atteindre les 10 $\mu\text{m}/\text{mn}$ en 6 minutes, et s'orienter dans le sens de l'écoulement : le cosinus moyen atteint 0,8 (voir la figure 3.2 et 3.3).

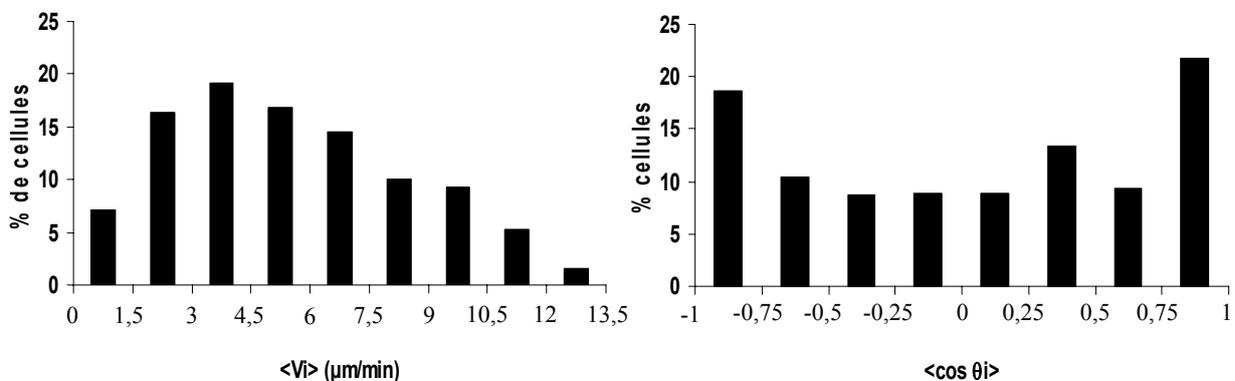


Fig 3.1 : Distribution des vitesses et orientations moyennes des cellules AX2 en mouvement sans contrainte appliquée.

3.1.2 Application d'une contrainte à $[Ca]_{ext}$ libre constant

Dans le tampon SB, la concentration de calcium libre contaminant est de $5 \mu\text{M}$. Lorsqu'on ajoute dans le tampon une forte concentration de calcium (1 mM) sous forme de chlorure de calcium, on observe une augmentation très significative de la vitesse des cellules (figure 3.2) : elle passe de 9 (sans flux) à 26 (avec flux) $\mu\text{m}/\text{mn}$. La présence de calcium stimule également la vitesse des cellules V_b en l'absence de contrainte appliquée : elle passe de 3 à $9 \mu\text{m}/\text{mn}$. la vitesse des cellules se stabilise au bout de 5 minutes à une valeur V_m . C'est la vitesse mesurée dans nos expériences de motilité sous flux.

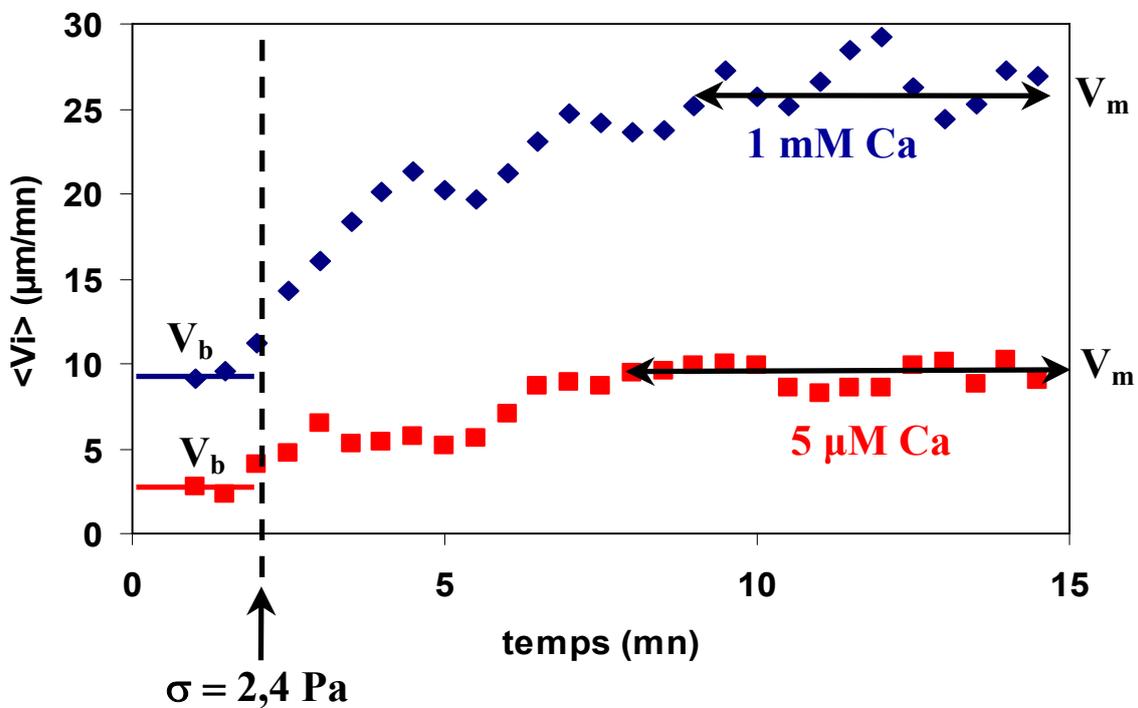


Fig 3.2 : Vitesse instantanée des cellules AX2, avec et sans calcium ajouté. La contrainte est appliquée deux minutes après le début de l'expérience (flèche simple). V_b : vitesse à contrainte nulle. V_m : valeur moyenne de la vitesse après la réponse transitoire.

En revanche, comme on peut le voir sur la figure 3.3, l'ajout de calcium dans le tampon ne modifie pas la réponse en orientation des cellules.

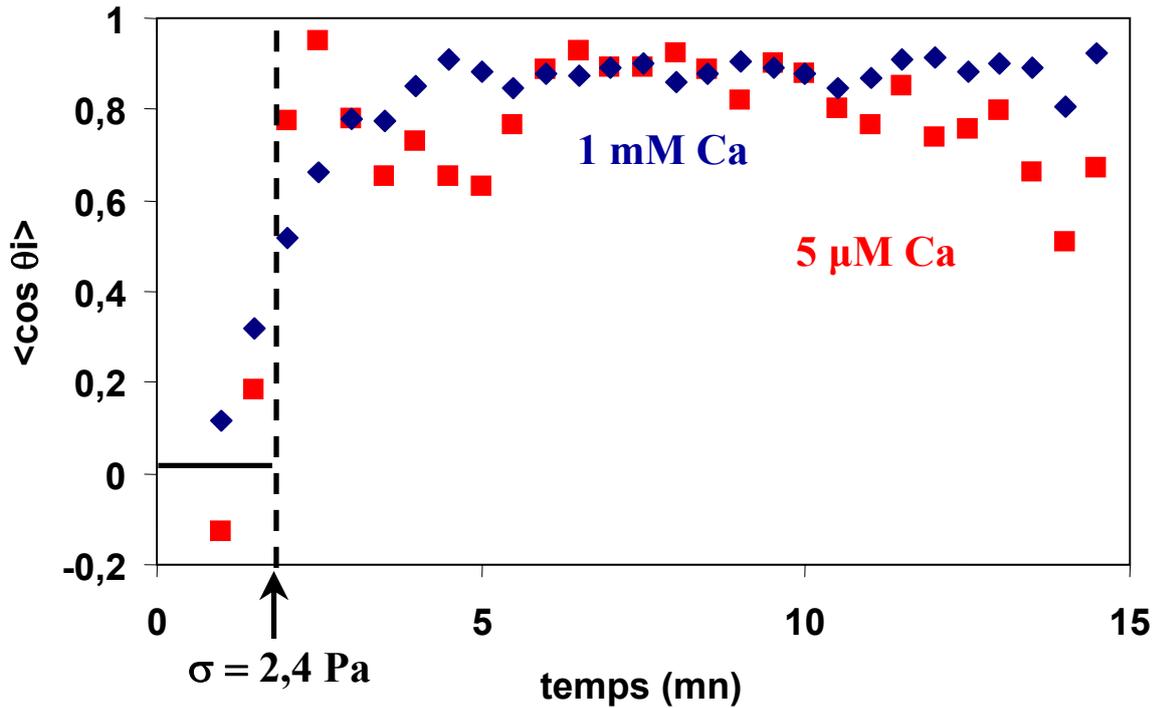


Fig 3.3 : Orientation des cellules AX2 par rapport au flux, avec et sans calcium ajouté. La contrainte est appliquée deux minutes après le début de l'expérience. Les résultats de la figure 3.2 et 3.3 correspondent à la même expérience.

Cette augmentation de la vitesse des cellules est spécifique au calcium. En effet, la variation de la concentration de cations monovalents (Na^+ , K^+) ou divalents (Mg^{2+}) n'a aucun effet à concentration équivalente. De plus, la substitution des ions phosphate PO_4^{2-} par le MES^{2-} (acide morpholino éthanesulfonique) n'affecte pas la vitesse des cellules. Le pH des tampons, entre 5,5 et 7,5, n'influe pas non plus sur le mouvement des cellules.

Nous avons ensuite fait varier la concentration de calcium libre dans le tampon, de 0,5 à 1000 μM . Dans cette gamme de concentrations, il n'y a pas de précipitation de phosphate de calcium. Pour tester la motilité cellulaire aux faibles concentrations de calcium ($< 5 \mu\text{M}$), on ajoute de l'EGTA en solution, qui se lie au calcium libre et en fait baisser la concentration. La vitesse est mesurée une fois la réponse stabilisée, comme sur la figure 3.2. Comme le montre la figure 3.4, plus il y a de calcium libre en solution, plus la vitesse instantanée moyenne est grande. La forme de la courbe liant la vitesse à la concentration de calcium suggère que le calcium agit sur une cible unique, avec une affinité apparente de 25 μM , sans coopérativité. La vitesse maximale mesurée de 25 $\mu\text{m}/\text{min}$ est la plus grande vitesse observée chez *D. discoideum* en reptation ambiante.

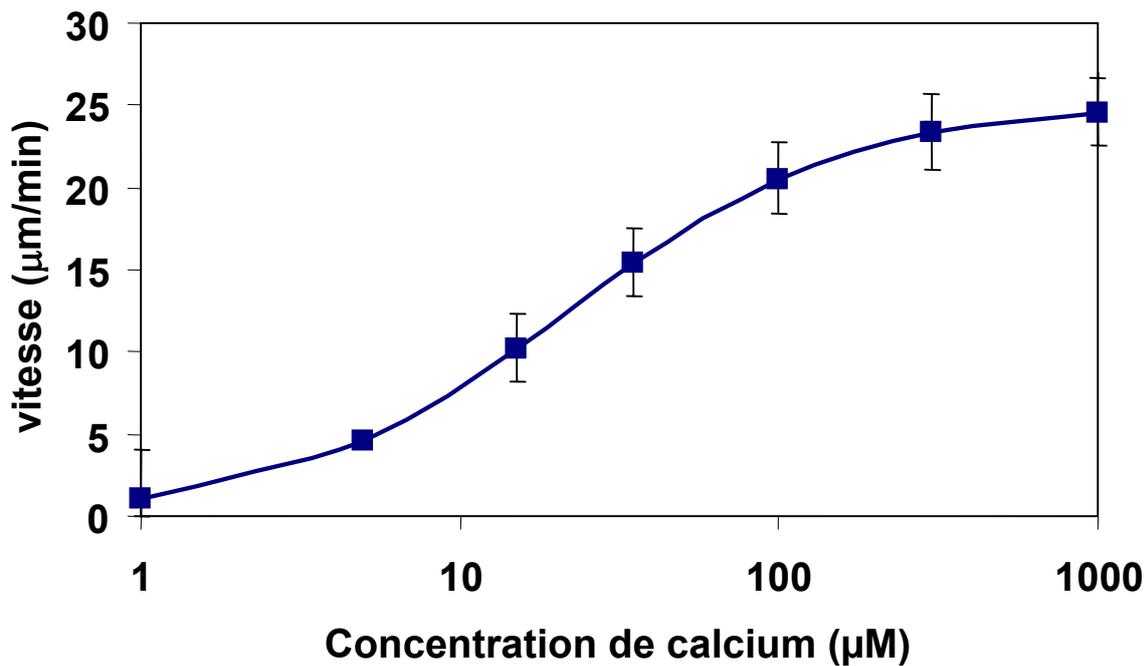


Fig 3.4 : Vitesse instantanée moyenne des cellules sauvages AX2 en fonction de la concentration de calcium libre à la contrainte $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$. La courbe

correspond à l'équation $v = V_{\max} \frac{[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + K_{\text{motilité}}}$ avec $K_{\text{motilité}} = 25 \mu\text{M}$ et $V_{\max} = 25 \mu\text{m/min}$.

A ce stade de nos expériences, l'effet du calcium sur la vitesse n'est pas uniquement lié à l'application de la contrainte hydrodynamique, puisque on observe la même augmentation de vitesse à contrainte nulle. Cette aspect sera revu dans le paragraphe 3.1.4 lorsque nous ferons varier la contrainte appliquée aux cellules.

3.1.3 Variation de la concentration de calcium libre à force constante.

Nous avons également voulu savoir comment les cellules réagissent à un changement brutal de la concentration de calcium à contrainte constante.

Expérimentalement, on laisse les cellules adhérer en tampon SB, puis on applique la contrainte désirée et on lance l'enregistrement. Après deux minutes, on change de réservoir en amont et on applique un tampon SB contenant du calcium à une concentration différente. Le changement de composition de fluide au niveau des parois est assez rapide (environ 10 secondes) comparés au temps d'attente entre chaque image.

Lorsque la concentration de calcium passe de 5 à 100 μM , on observe d'abord une diminution transitoire de la vitesse, puis au bout d'une minute, la vitesse augmente et atteint un maximum

au bout de 4 minutes (figure 3.5). Ensuite, la vitesse redescend doucement jusqu'à une valeur proche de celle qu'elle avait à 5 μM de calcium. Quand on passe de 5 μM de calcium libre à 1 mM, l'évolution est la même, mais la vitesse maximale est atteinte plus rapidement, est plus élevée et persiste plus longtemps. Les vitesses maximales atteintes sont comparables à celles obtenues en réponse à l'application de la contrainte (figure 3.4). En revanche, il n'y a pas de changement moyen dans l'orientation des cellules (figure 3.6).

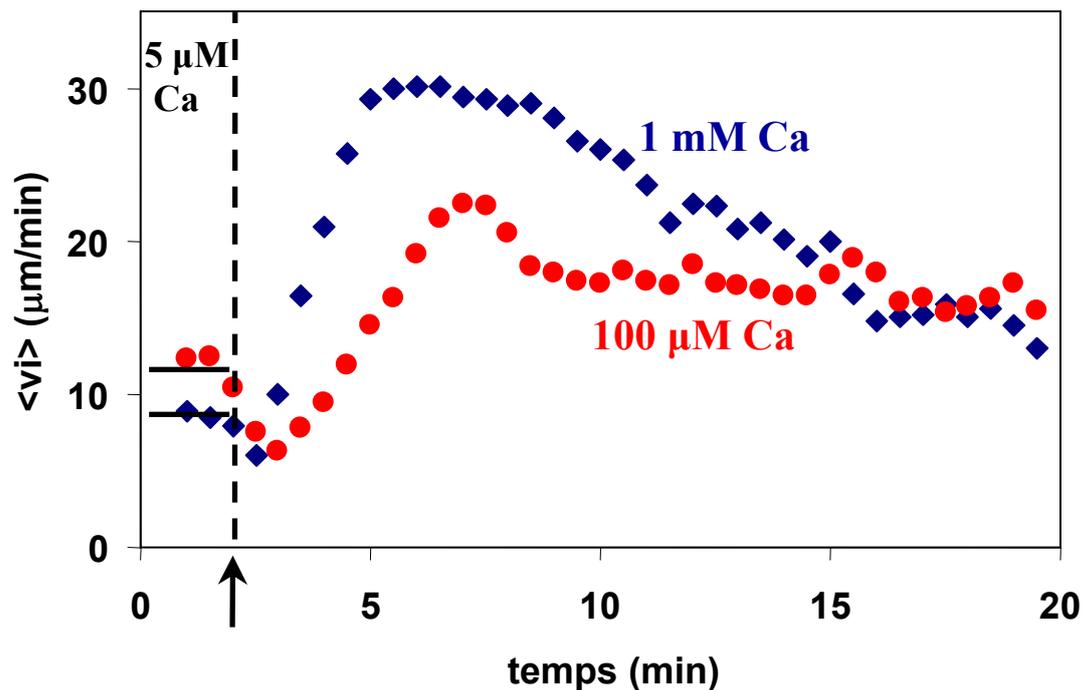


Fig 3.5 : Vitesse instantanée des cellules AX2 en réponse à un changement de la concentration de calcium externe. La contrainte est constante et vaut $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$ tout au long de l'expérience. La concentration de calcium varie deux minutes après le début de l'expérience (flèche)

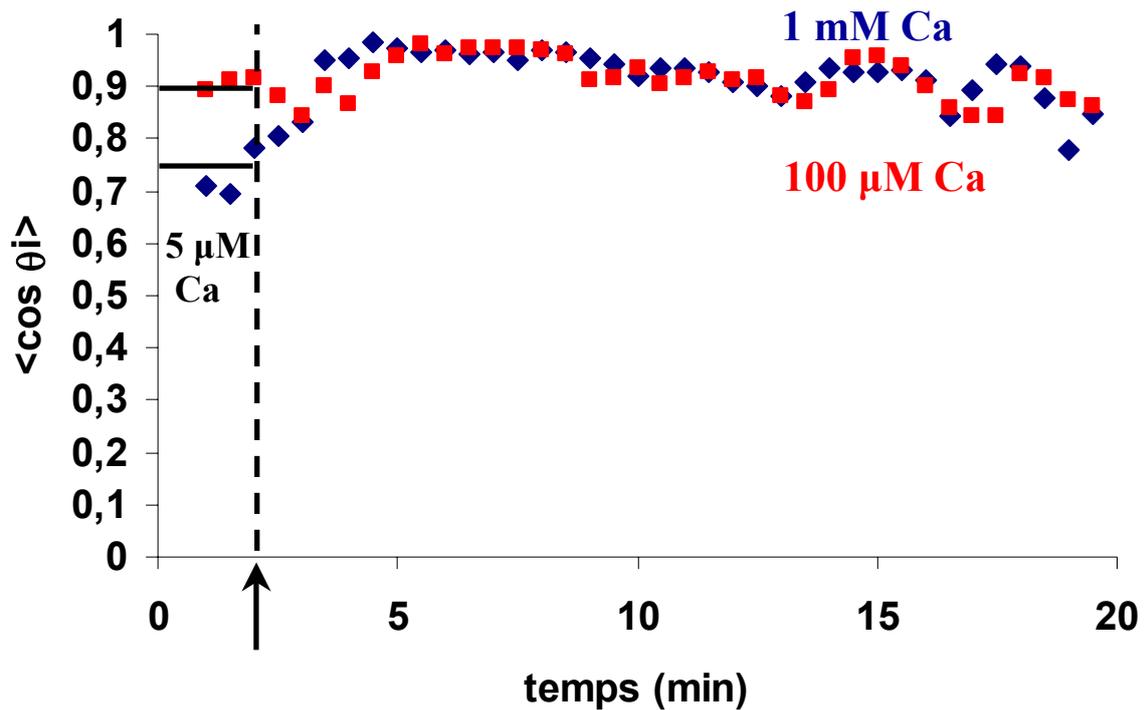


Fig 3.6 : Orientation des cellules AX2 en réponse à un changement de la concentration de calcium externe. La contrainte est constante et vaut $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$ tout au long de l'expérience. La concentration de calcium varie deux minutes après le début de l'expérience (flèche). Les résultats de la figure 3.5 et 3.6 correspondent à la même expérience.

Nous avons également diminué la concentration de calcium libre dans le tampon en faisant passer une solution contenant $100 \mu\text{M}$ d'EGTA. Dans ces conditions, où la concentration de calcium libre vaut $0,4 \mu\text{M}$, le mouvement des cellules s'arrête très rapidement, en moins de 30 secondes. Lorsque on rajoute du calcium à concentration saturante dans le tampon, les cellules repartent à des vitesses aussi grandes que celles observées précédemment (figure 3.7).

Nous avons également remarqué qu'au bout de cinq minutes en présence d'EGTA à $100 \mu\text{M}$, les cellules repartent à une vitesse plus faible ($10 \mu\text{m}/\text{min}$: résultat non montré).

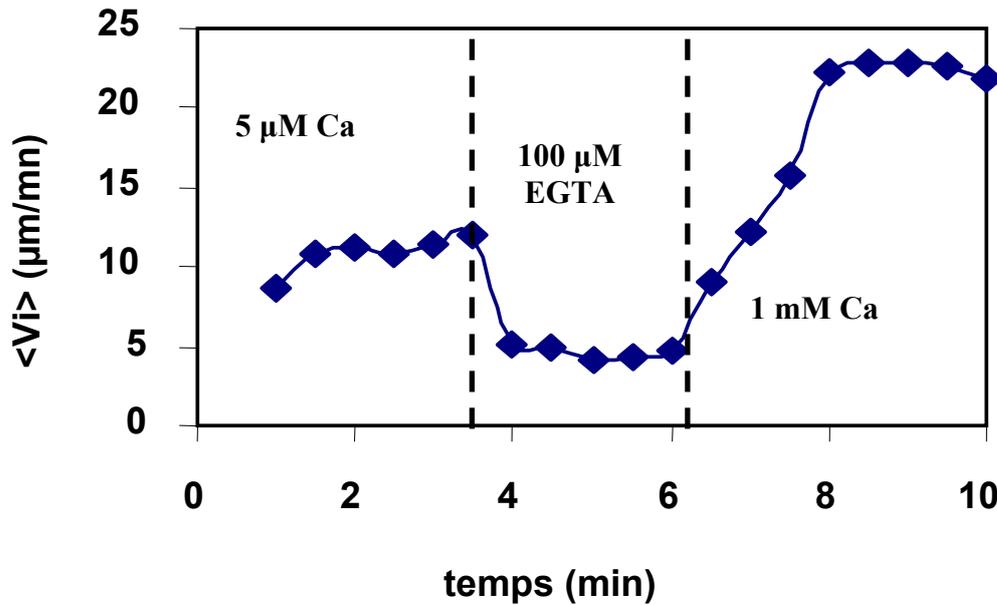


Fig 3.7 : Effet de la diminution du calcium libre sur la vitesse des cellules induite par un flux ($\sigma = 2.4 \text{ pa}$). Aux moments indiqués, la composition du fluide change.

En présence d'EGTA, nous avons aussi constaté qu'un grand nombre de cellules se détachent, ce qui signifie que le calcium joue aussi sur l'adhérence cellulaire. Les travaux de Décavé ont montré que l'énergie d'interaction cellule-substrat est proportionnelle à la contrainte seuil de détachement (Decave et al., 2002). C'est la contrainte pour laquelle 50% des cellules se détachent, au bout d'un temps suffisant (10 minutes). Décavé et al. ont montré que la valeur de cette contrainte ne dépend pas de l'activité du cytosquelette, mais des propriétés adhésives des cellules. Nous avons mesuré la contrainte de détachement en fonction de la concentration de calcium, en utilisant la chambre à flux radial. Ces expériences ont été réalisées en présence de CIPC (N-(3-chlorophényl) carbamate), un agent dépolymérisant des cytosquelettes d'actine et de tubuline, afin d'éliminer la réponse active des cellules. Ainsi, le mouvement cellulaire est stoppé sans pour autant que les propriétés d'adhérence soient changées. Comme le montre la figure 3.8, plus il y a de calcium libre en solution, plus la contrainte seuil de détachement $\sigma_{50\%}$ est élevée. La forme de la courbe liant $\sigma_{50\%}$ à la concentration de calcium montre que le calcium agit sur une cible unique, avec une affinité apparente de $2 \mu\text{M}$, sans coopérativité. Elle est douze fois plus faible que l'affinité apparente du calcium sur la vitesse cellulaire.

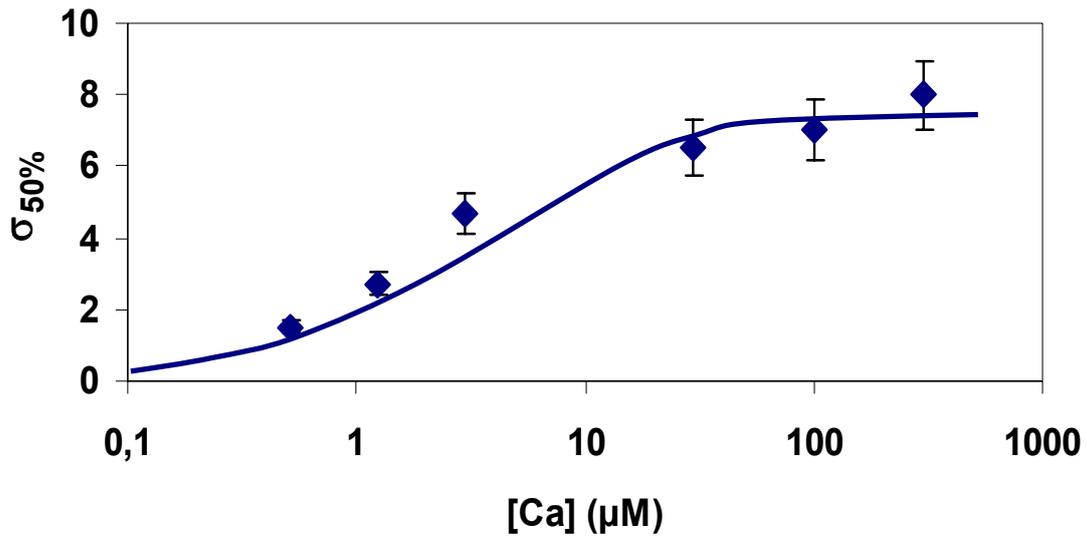


Fig 3.8 : Contrainte seuil de détachement $\sigma_{50\%}$ de cellules AX2 en fonction de la concentration de calcium libre. La courbe correspond à l'équation

$$\sigma_{50\%} = \sigma_{\max} \frac{[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + K_{adh}} \text{ avec } K_{adh} = 2 \mu M, \sigma_{\max} = 8 Pa.$$

Ces résultats montrent que l'augmentation de la vitesse des cellules ne dépend pas de l'adhérence, puisque les affinités sont très différentes : la contrainte seuil de détachement varie très peu entre 30 et 1000 μM de calcium libre, alors que la vitesse des cellules double dans cette fourchette. Il est vraisemblable que la cible du calcium ne soit pas externe, mais interne à la cellule. Il y aurait donc un flux de calcium de l'extérieur vers l'intérieur.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un ion homologue du calcium, le gadolinium, dont on sait qu'il bloque compétitivement les canaux calciques transmembranaires. Et, en effet, lorsque on ajoute 100 μM de chlorure de gadolinium ($GdCl_3$) dans le tampon, les cellules voient leur vitesse fortement diminuer, même en présence d'un millimolaire de calcium (figure 3.9).

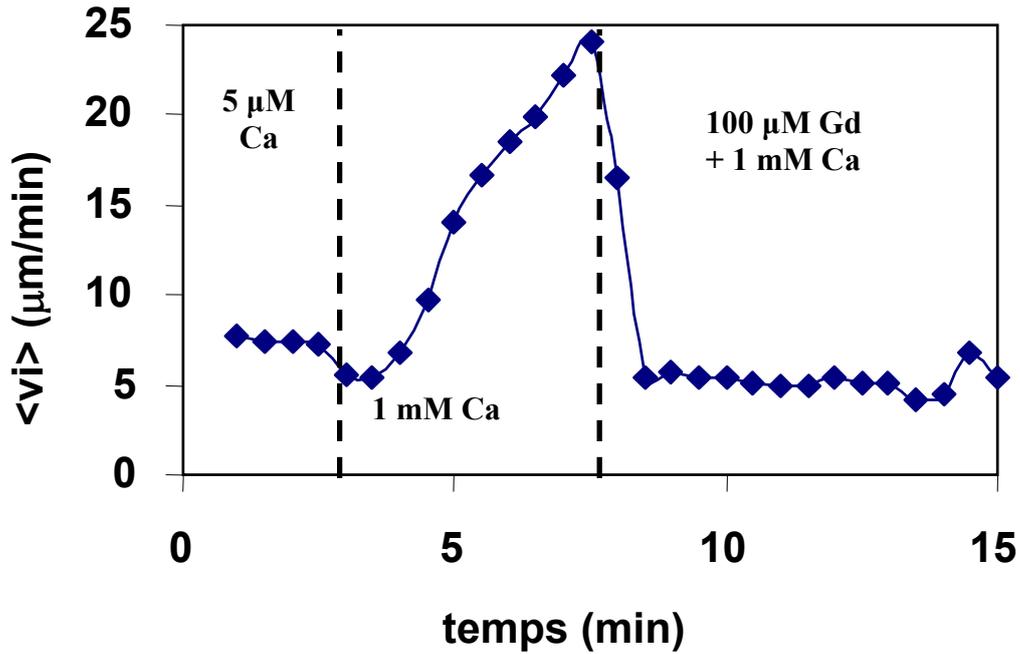


Fig 3.9 : Effet du gadolinium sur la vitesse instantanée des cellules sauvages AX2. La contrainte appliquée vaut $\sigma = 2,4$ Pa. La composition du fluide change aux instants indiqués.

L'observation du film avec lequel nous avons fait le graphe de la figure 3.9 montre que l'ajout de gadolinium réduit l'adhérence des cellules, mais beaucoup plus lentement (10 minutes). L'adhésion des cellules et la motilité apparaissent encore comme deux phénomènes distincts. Enfin, l'action du gadolinium est quasi irréversible, puisque le retour à un tampon SB contenant 1 mM de calcium ne suffit pas à restaurer l'adhérence et la motilité des cellules (non montré).

L'ensemble de ces résultats confirme la sensibilité des cellules au calcium libre externe, qui agit uniquement sur la vitesse des cellules. Cet effet est différent de l'effet du calcium sur l'adhérence, puisque les affinités apparentes et les temps de réponse à l'EGTA et au gadolinium sont très différents. L'inhibition par le gadolinium est une indication expérimentale de l'existence de canaux ioniques à la membrane plasmique impliqués dans la vitesse cellulaire. Le comportement des cellules est différent, suivant que l'on change la contrainte appliquée à une concentration de calcium donnée, ou bien que l'on change la concentration de calcium à une contrainte donnée. Dans ces dernières conditions, la réponse des cellules est complexe, ce qui suggère une adaptation des cellules à leur environnement. Nous verrons plus tard que celle-ci est corrélée à un changement morphologique des cellules. Etant donné que la réponse à une contrainte hydrodynamique des cellules adaptées à une

concentration de calcium donnée est plus simple, nous nous placerons dorénavant dans ce cas (situation expérimentale des figures 3.2 et 3.3).

3.1.4 Sensibilité des cellules aux forces

Pour faire varier la contrainte appliquée, nous pouvons d'une part contrôler le débit D de l'écoulement, et d'autre part l'épaisseur e entre la lame et le dessus de la chambre. Pour des faibles contraintes, il est plus pratique d'augmenter l'épaisseur que d'avoir des débits très faibles. On mesure, à chaque valeur de σ , la vitesse instantanée et l'orientation moyenne des cellules d'une part à $5 \mu\text{M}$ de calcium libre dans le tampon et d'autre part à 1 mM de calcium (figures 3.10 et 3.11).

La vitesse des cellules en réponse à une contrainte appliquée est différente à 1 mM et à $5 \mu\text{M}$ de calcium libre. A 1 mM , la vitesse instantanée moyenne augmente très rapidement en fonction de la contrainte pour arriver à un plateau de $28 \mu\text{m}/\text{min}$ pour des contraintes supérieures à $0,8 \text{ Pa}$. En comparaison, la vitesse des cellules à $5 \mu\text{M}$ augmente beaucoup plus lentement, et atteint $20 \mu\text{m}/\text{min}$ à $7,1 \text{ Pa}$. Si on compare les contraintes pour lesquelles les cellules atteignent la moitié de la vitesse maximale, les cellules sont sept fois plus sensibles aux forces à 1 mM qu'à $5 \mu\text{M}$ de calcium.

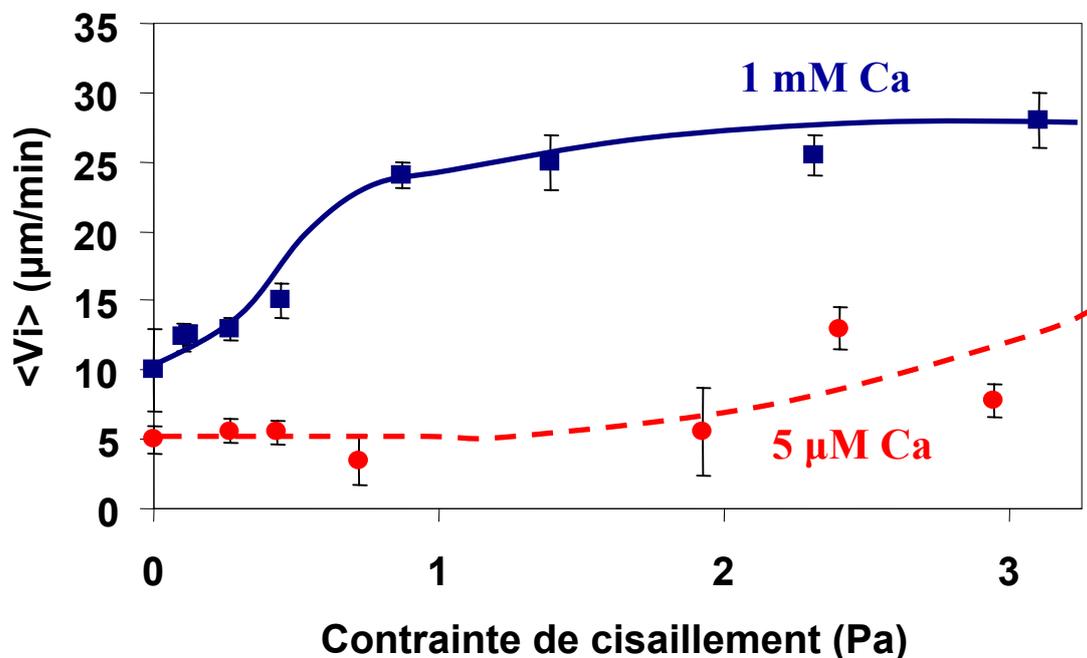


Fig 3.10 : Vitesse instantanée moyenne des cellules AX2 en fonction de la contrainte appliquée, à $5 \mu\text{M}$ et à 1 mM de calcium libre..

L'orientation des cellules en réponse à une contrainte appliquée est là encore très proche à 1 mM et à 5 μ M de calcium libre. De plus, l'étude de l'orientation des cellules en fonction de la contrainte appliquée apporte des renseignements qui n'avaient pas été vus par Décavé et al. (figure 3.11). On observe trois types de comportements en fonction de la valeur de la contrainte :

- Quand la contrainte appliquée est supérieure à 0,6 Pa, les cellules sont orientées constamment dans le sens du flux quelle que soit la concentration de calcium externe.
- Quand la contrainte appliquée est inférieure à 0,6 Pa, et supérieure à 0,1 Pa, les cellules s'orientent initialement dans le sens du flux juste après l'application de la force, mais au bout de 5 minutes, elles prennent un mouvement opposé au flux. Ce comportement complexe sera décrit plus en détail avec la figure 3.12.
- Pour des contraintes inférieures à 0,1 Pa, le mouvement des cellules est quasiment isotrope, et ce quelle que soit la concentration de calcium dans le tampon. C'est le seuil de sensibilité de *D. discoideum* aux contraintes mécaniques.

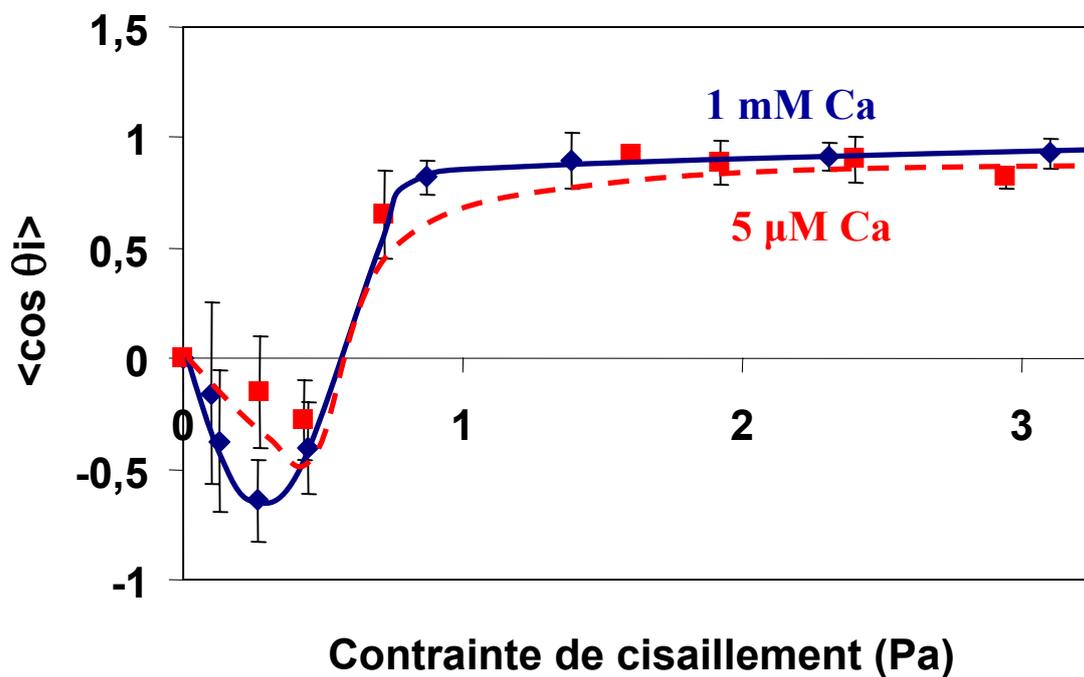


Fig 3.11 : Orientation des cellules AX2 en fonction de la contrainte appliquée, à 5 μ M et à 1 mM de calcium libre. Les résultats présentés figure 3.10 et 3.11 correspondent aux mêmes expériences.

Sur la figure 3.12, on donne trois exemples représentatifs de ces trois comportements obtenus respectivement à 0.1, 0.5 et 1 Pa.

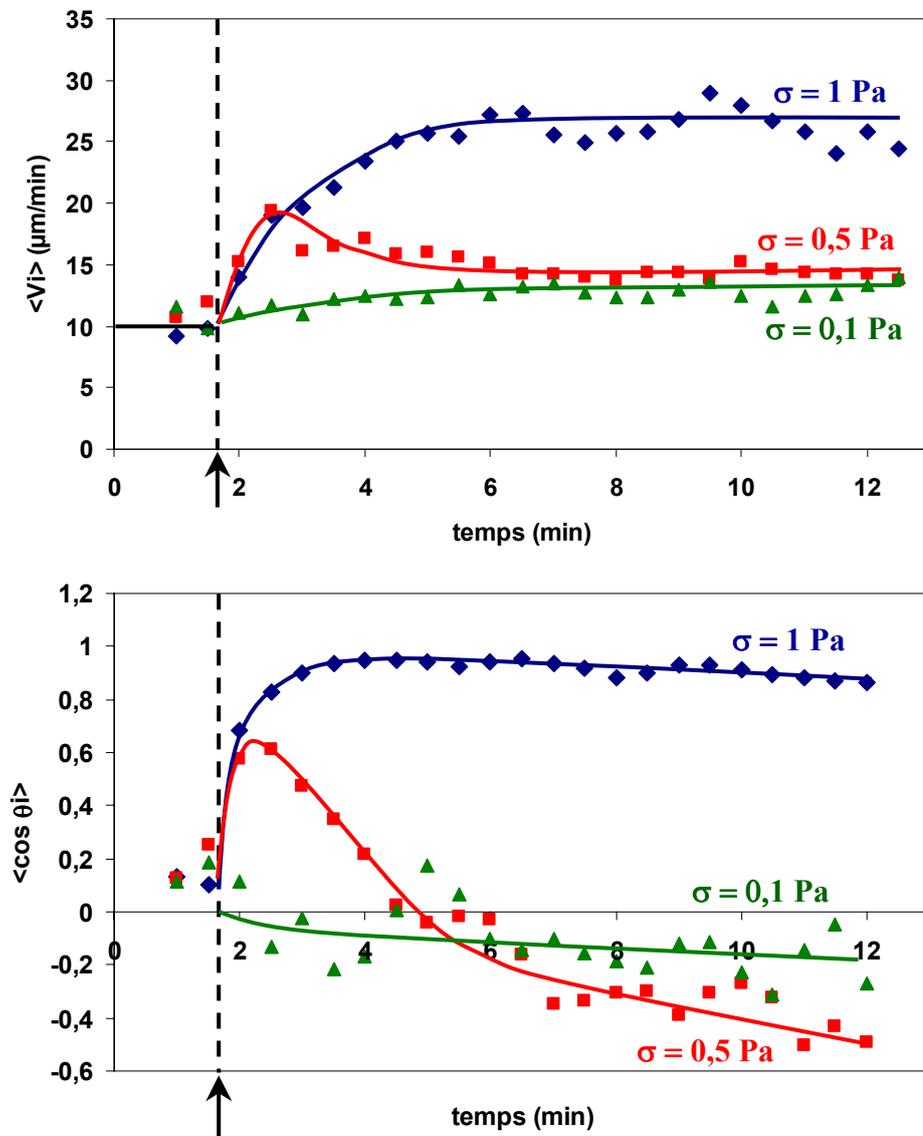


Fig 3.12 : Vitesse et orientation des cellules AX2 à différentes contraintes appliquées, avec 1 mM de calcium libre. La contrainte est appliquée 1,5 minutes après le début de l'enregistrement.

- $\sigma = 1$ Pa : la vitesse des cellule augmente constamment avec un temps de réponse de 1,5 minutes. Les cellules s'orientent immédiatement dans le sens du flux.
- $\sigma = 0,5$ Pa : la vitesse des cellules augmente à l'application de la contrainte, et les cellules s'orientent dans le sens du flux. Mais au bout d'une minute, la vitesse commence à diminuer pour se stabiliser 5 minutes après à 15 μm/min. Parallèlement,

de plus en plus de cellules changent de direction et remontent le flux ($\cos\theta$ diminue). Au bout de cinq minutes, la vitesse instantanée moyenne est stabilisée et il y a autant de cellules qui remontent le flux que de cellules allant dans le sens du flux ($\cos\theta = 0$). Ensuite, de plus en plus de cellules remontent le flux, si bien que la majorité d'entre elles vont à contre-courant à la fin de l'expérience ($\cos\theta$ négatif).

- $\sigma = 0,1$ Pa : la vitesse des cellules augmente très peu (de 10 à 12 $\mu\text{m}/\text{min}$ en 6 minutes) et le mouvement reste quasiment isotrope (le cosinus moyen vaut $-0,1$ à la fin de l'expérience).

Dans tous les cas, le comportement moyen des cellules est orienté suivant deux directions : dans le sens de l'écoulement ou contre l'écoulement (voir figure 3.13). Les cellules ont un comportement bi-directionnel, particulièrement remarquable dans la fourchette de contraintes allant de 0,1 à 0,6 Pa.

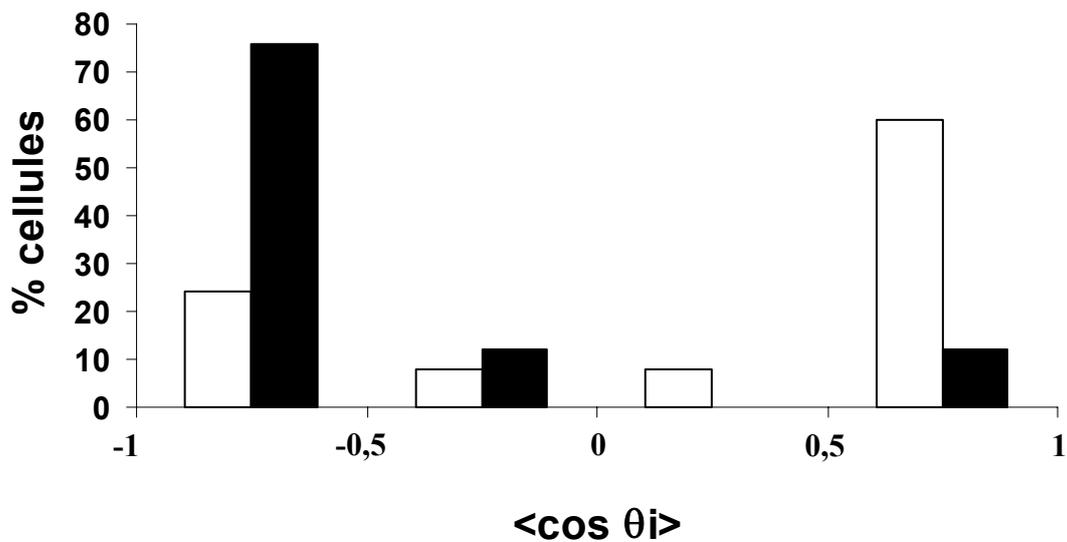


Fig 3.13 : *distribution angulaire des cellules AX2 : en blanc la distribution de l'orientation cellulaire moyenne durant les cinq premières minutes, en noir la distribution de l'orientation cellulaire moyenne entre 10 et 15 minutes après l'application de la force. $\sigma = 0,5$ Pa, $[Ca] = 1$ mM : données provenant de la figure 3.12.*

Le calcium n'a pas d'effets sur l'orientation des cellules, ni sur le seuil de sensibilité des cellules aux forces appliquées. Ainsi, l'effet du calcium ne concerne que la vitesse instantanée moyenne des cellules. Ces résultats complètent ceux obtenus au paragraphe 3.1.2 : le calcium non seulement augmente la vitesse, mais également la sensibilité des cellules aux

forces appliquées. La présence de calcium amplifie donc la réponse motile des cellules au flux hydrodynamique appliqué.

3.2 Comportement de cellules mutantes

La mesure de la vitesse et de l'orientation des cellules sauvages AX2 en réponse à un flux suggère fortement que l'entrée de calcium externe via des canaux transmembranaires amplifie la réponse des cellules aux contraintes de cisaillement.

A l'intérieur de la cellule, le calcium participe à de nombreuses chaînes de signalisation intracellulaires. Quelle cascade de réactions permet à la cellule d'avoir un mouvement orienté lorsque elle est soumise à une force ? Nous avons voulu répondre à cette question en étudiant des souches mutantes, obtenues par invalidation de gènes. Ces mutants confirment le rôle du calcium dans la motilité cellulaire.

3.2.1 Cellules mutantes $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$

Les cellules $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$ sont des mutants créés par Peter Devreotes à partir de la souche sauvage DH1 (Wu et al., 1995). Le gène qui code pour la sous-unité β des protéines G hétérotrimériques a été supprimé, rendant les protéines $G\alpha\beta\gamma$ non fonctionnelles, quel que soit l'isoforme $G\alpha$. Le chimiotactisme des cellules $G\beta\Delta$ est déficient : elles ne réagissent pas aux gradients chimiques d'AMP cyclique (AMPC) et de folate. Il est donc intéressant de voir si ces cellules réagissent aux forces appliquées. De plus, des récepteurs spécifiques à l'AMPC déclenchent une entrée de calcium via l'activation des protéines G hétérotrimériques. Nous avons voulu aussi savoir si l'activation des protéines G hétérotrimériques est nécessaire à l'entrée de calcium, dont nous avons vu qu'elle augmente la réponse aux forces. Les cellules $G\beta\Delta+G\beta$ sont des cellules $G\beta\Delta$ complétées par un plasmide rétablissant l'expression de $G\beta$ et donc l'activation des protéines G hétérotrimériques. Cette souche sera utilisée comme référence.

Tout d'abord, les cellules $G\beta\Delta$ sont bien sensibles aux forces appliquées, puisque leur vecteur vitesse s'oriente dans le sens du flux en réponse à la contrainte appliquée (figure 3.14).

Nous avons mesuré la vitesse et l'orientation des cellules $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$, en faisant varier d'une part la concentration de calcium dans le tampon et d'autre part la contrainte appliquée (voir § 3.1).

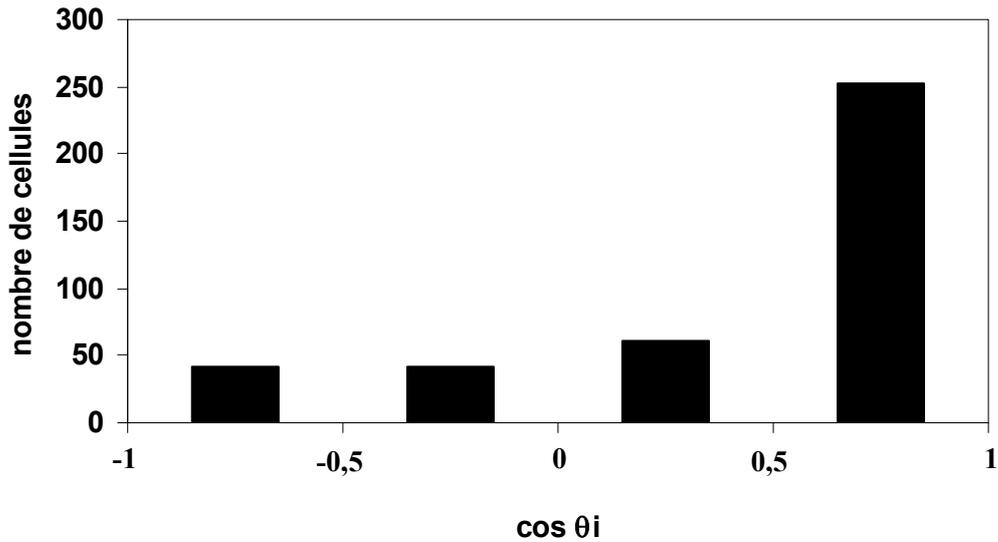


Fig 3.14 : Orientation moyenne des cellules $G\beta\Delta$ sous flux, en tampon SB sans calcium ajouté ($5 \mu\text{M}$). La contrainte vaut $2,4 \text{ Pa}$.

Tout d'abord, lorsqu'à contrainte constante on change la concentration de calcium de $5 \mu\text{M}$ à 1 mM , les mutants $G\beta\Delta+G\beta$ ont un comportement très proche des cellules sauvages : leur vitesse augmente. Par contre, il n'y a aucun changement de vitesse pour les cellules $G\beta\Delta$ (fig. 3.15).

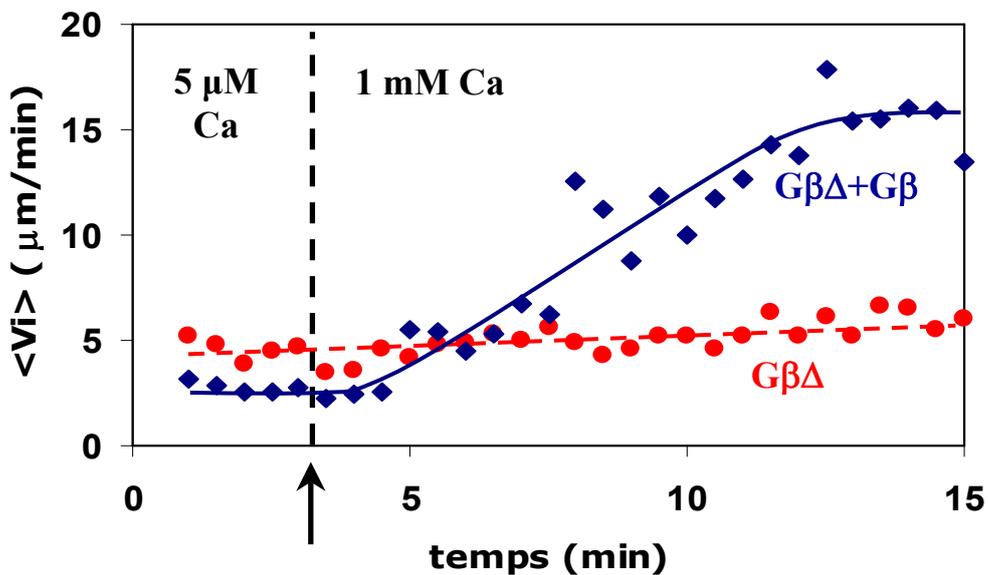


Fig 3.15 : Vitesse instantanée des cellules $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$ en réponse à un changement de la concentration de calcium externe. La contrainte est constante et vaut $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$ tout au long de l'expérience. La concentration de calcium varie deux minutes après le début de l'expérience (flèche). La vitesse des cellules complémentées à $5 \mu\text{M}$ de calcium est significativement plus faible que celle des mutants nuls.

On retrouve ce résultat lorsque on applique une contrainte à des cellules $G\beta\Delta+G\beta$ et $G\beta\Delta$ dans un tampon contenant des concentrations variables de calcium. Les souches $G\beta\Delta$ sont insensibles à la concentration de calcium externe libre tandis que la vitesse des cellules $G\beta\Delta+G\beta$ augmente avec la concentration de calcium (figure 3.16). Néanmoins, l'affinité apparente de cette stimulation est décalée par rapport au cas des cellules sauvages AX2 ($K = 100 \mu\text{M}$) et la vitesse maximale atteinte est plus faible ($15 \mu\text{m}/\text{min}$).

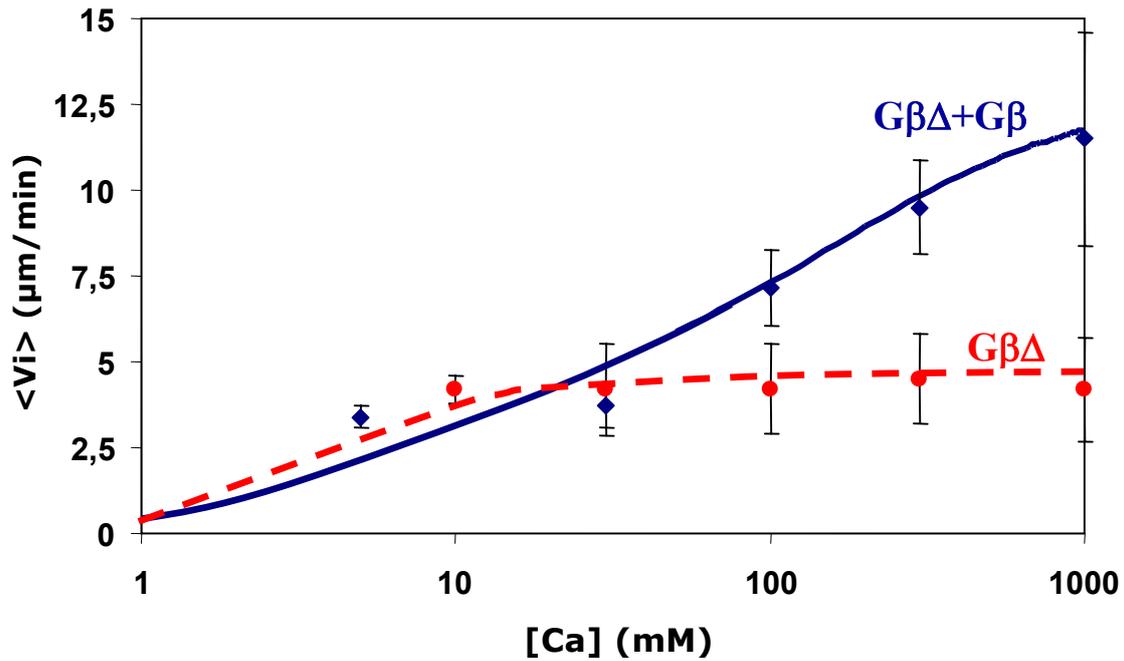


Fig 3.16 : Vitesse instantanée moyenne des cellules $G\beta\Delta+G\beta$ en fonction de la concentration de calcium libre à la contrainte $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$. La courbe correspond à

$$l'équation \quad V = V_{\max} \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Ca}^{2+}] + K} \quad \text{avec } K = 100 \mu\text{M} \text{ et } V_{\max} = 15 \mu\text{m}/\text{min}.$$

Là encore, la concentration de calcium n'influe pas sur l'orientation des cellules $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$ (non montré).

Les cellules $G\beta\Delta$ sont donc bien capables de ressentir les forces appliquées, mais leur vitesse est beaucoup plus faible que celle des AX2 aux mêmes concentrations de calcium et à la même valeur de la contrainte appliquée. Peut-être les cellules $G\beta\Delta$ sont-elles moins sensibles aux forces que les cellules sauvages AX2. On a donc testé la motilité et l'orientation des mutants $G\beta\Delta$ et du contrôle $G\beta\Delta+G\beta$ en fonction de la contrainte appliquée (figure 3.17). Alors que la vitesse des cellules $G\beta\Delta+G\beta$ augmente avec la contrainte, les cellules $G\beta\Delta$ conservent presque la même vitesse quelle que soit la contrainte de cisaillement. Par contre

on retrouve, pour les deux souches, les trois types de comportement qui ont été discutés pour les cellules AX2. Cependant, les seuils sont légèrement différents :

- Le seuil de sensibilité se trouve à 0,5 Pa pour les deux souches.
- Les cellules $G\beta\Delta$ sont orientées dans le sens du flux pour des contraintes supérieures à 1,8 Pa, et les cellules $G\beta\Delta+G\beta$ pour des contraintes supérieures à 1,3 Pa.
- Les deux souches présentent également un comportement bi-directionnel pour des contraintes comprises entre 0,5 et 1,3 Pa pour les cellules $G\beta\Delta+G\beta$, et entre 0,5 et 1,8 Pa pour les cellules $G\beta\Delta$.

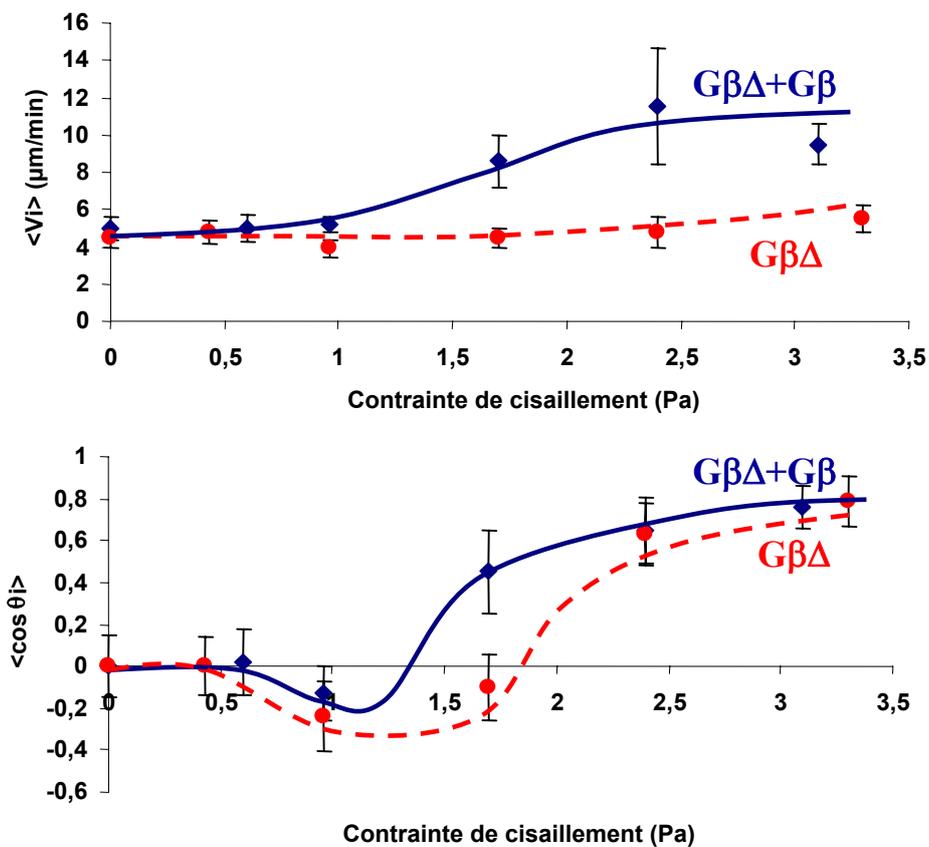


Fig 3.17 : Vitesse et orientation des cellules $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$ en fonction de la contrainte appliquée. $[Ca] = 1 \text{ mM}$

L'absence de protéines G hétérotrimériques fonctionnelles rend la vitesse des cellules $G\beta\Delta$ insensibles aux variations de la concentration de calcium dans le tampon. Elles restent cependant sensibles aux forces hydrodynamiques, comme en atteste l'étude de l'orientation moyenne des cellules.

3.2.2 Cellules R-IP₃Δ

Il est connu que, chez les cellules eucaryotes supérieures, les protéines G hétérotrimériques activent des isoformes de la phospholipase C, qui clivent le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP₂), un phospholipide de la membrane plasmique, en diacylglycerol (DAG) et en inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃). Chez *D. discoideum*, on n'est pas sûr que les protéines G activent directement la phospholipase C. Mais cette phospholipase C est activée par le calcium (Drayer et al., 1994; Rebecchi and Pentylala, 2000), dont l'entrée par la cellule est contrôlée par l'activation des protéines G hétérotrimériques. Or, l'IP₃ soluble déclenche le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, en se liant à des récepteurs spécifiques à l'IP₃. Chez *D. discoideum*, un gène a été trouvé (*iplA*) qui code pour un homologue de ces récepteurs sensibles à l'IP₃ (R-IP₃). L'invalidation de ce gène entraîne chez les mutants une réduction importante de l'entrée de calcium extracellulaire en réponse aux chimio-attractants (Traynor et al., 2000). Cependant, ces mutants sont toujours capables de chimiotactisme et répondent aux pulses d'AMPc en produisant eux-mêmes de l'AMPc ou du GMPc. La souche R-IP₃Δ a été créée par Rob Kay à partir de la souche sauvage axénique AX2 de son laboratoire. Nous utiliserons donc cette souche parentale AX2-RK comme contrôle. Nous avons mesuré la vitesse et l'orientation instantanées moyennes de ces deux souches à 2,4 Pa, en faisant varier la concentration de calcium.

Tout d'abord, les cellules R-IP₃Δ répondent bien au flux puisqu'elles s'orientent dans le sens de l'écoulement (figure 3.18), mais un peu moins bien que la souche parentale AX2-RK. Les deux souches sont également sensibles à une variation de la concentration de calcium externe, mais la réponse des cellules R-IP₃Δ est plus lente. La vitesse des cellules AX2 passe de 5 à 28 μm/min en 2 minutes, alors que la vitesse des mutants R-IP₃Δ augmente beaucoup plus lentement (au bout de 10 minutes, la vitesse vaut environ 20 μm/min). La vitesse des cellules R-IP₃Δ à la fin de l'expérience est plus faible alors que la vitesse de base est la même pour les deux souches (figure 3.19).

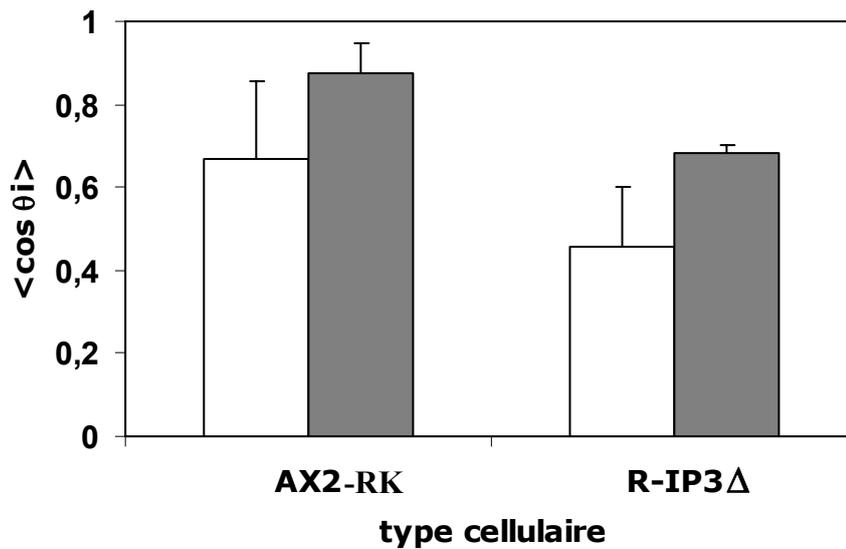


Fig 3.18 : Orientation des cellules à $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$, à $5 \mu\text{M}$ (colonnes blanches) et à 1 mM de calcium libre (colonnes grises).

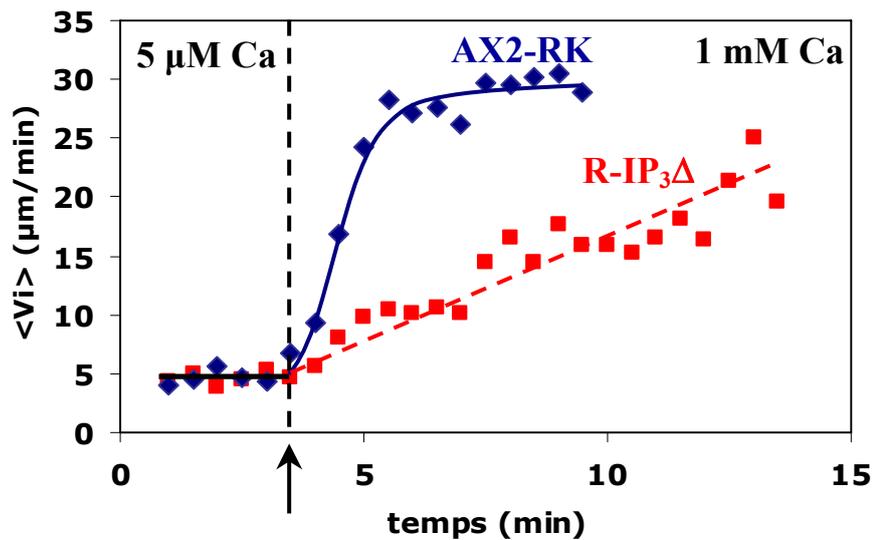


Fig 3.19 : Réponse des cellules AX2 et R-IP₃-Δ au changement de concentration de calcium, à contrainte constante ($\sigma = 2,4 \text{ Pa}$). Au moment indiqué (flèche), la concentration de calcium change.

On tire une conclusion semblable d'expériences dans lesquelles on mesure la réponse des cellules à une contrainte, pour différentes concentrations de calcium externe. La figure 3.20 montre l'évolution des vitesses instantanées moyennes des cellules AX2 et R-IP₃Δ en fonction de la concentration de calcium. Les mutants R-IP₃Δ sont plus rapides quand augmente la concentration de calcium dans le tampon SB, mais l' EC_{50} est de $450 \mu\text{M}$ contre $30 \mu\text{M}$ pour les cellules sauvages AX2-RK.

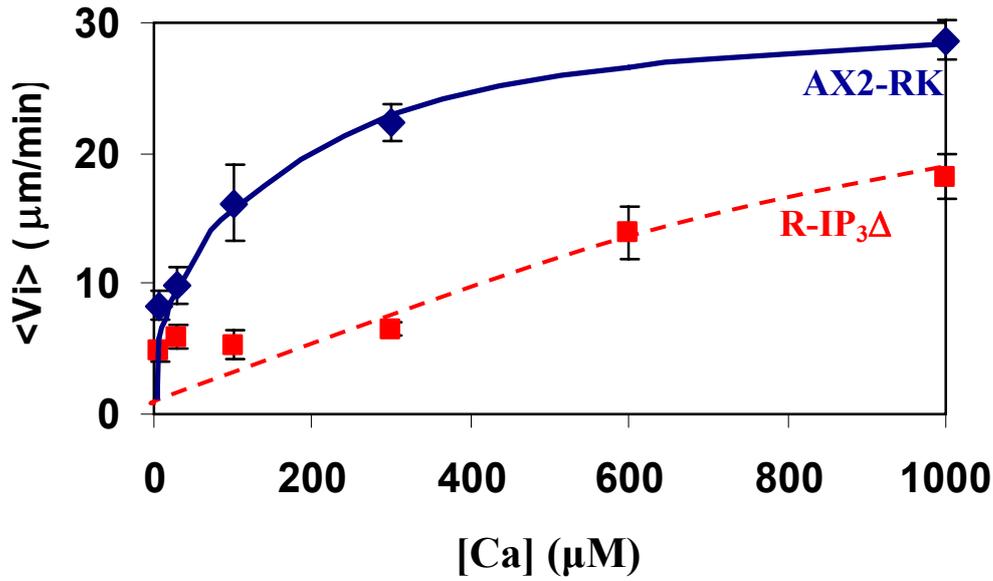


Fig 3.20 : Vitesse instantanée moyenne des cellules AX2 et R-IP₃Δ en fonction de la concentration de calcium libre à la contrainte $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$. La courbe bleue correspond à l'équation $V = V_{\max} \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Ca}^{2+}] + K}$ $K = 30 \mu\text{M}$. La courbe rouge est dessinée à la main.

Les cellules R-IP₃Δ sont un peu moins bien orientées que les cellules parentales (figure 3.21). Là encore, l'orientation cellulaire varie peu en fonction de la concentration de calcium libre dans le tampon.

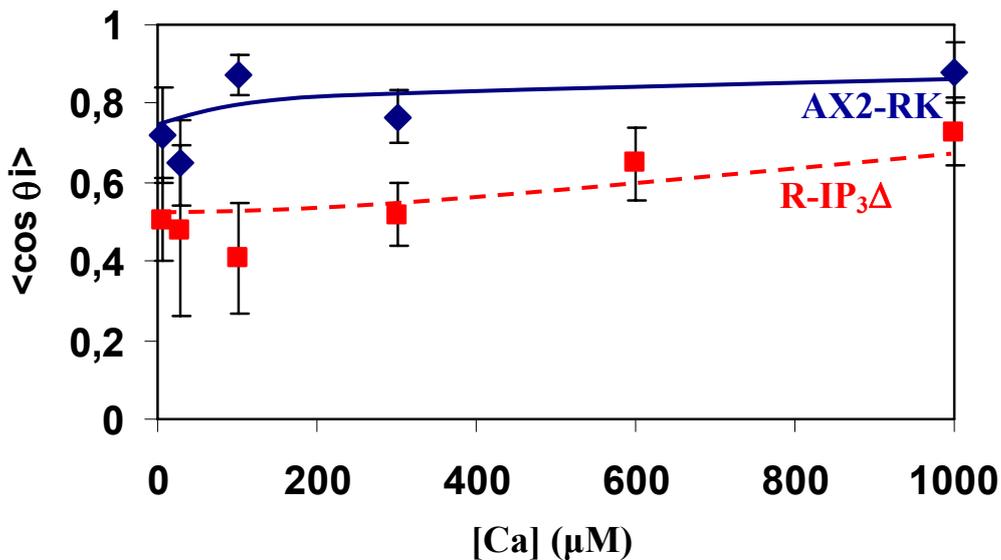


Fig 3.21 : Orientation des cellules en fonction de la concentration de calcium. $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$. Les courbes sont des supports visuels. Les résultats présentés figure 3.20 et 3.21 correspondent à la même expérience.

En conclusion, les cellules dépourvues de récepteurs à l'IP₃ sont donc sensibles à la force, puisqu'elles s'orientent dans le sens du flux. De même, elles sont sensibles à l'augmentation de la concentration de calcium dans le tampon en augmentant leur vitesse, mais elles répondent beaucoup moins vite et nécessitent des concentrations de calcium extra cellulaire plus élevées que les cellules sauvages parentales AX2. Le récepteur à l'IP₃ coopère donc avec l'entrée de calcium extra cellulaire pour favoriser la motilité cellulaire.

4 PARTIE II : Morphologie cellulaire et dynamique des zones de contact de cellules en mouvement sous flux

L'adhésion sur substrat couplée à l'émission de pseudopodes au niveau du bord avant et à la rétraction du bord arrière explique le mouvement amibien de *D. discoideum*. Connaissant maintenant l'effet du calcium sur l'adhésion cellule-substrat, nous avons étudié l'évolution de la morphologie des contours cellulaire en fonction de la concentration de calcium libre dans le tampon et en fonction de la contrainte hydrodynamique appliquée. Dans cette partie, nous étudions des cellules individuelles sous flux observées à fort grossissement en contraste de phase ou en microscopie par contraste interférentiel (RICM). La contrainte est la même dans toutes les expériences et vaut 2,4 Pa.

Nous avons d'abord corrélié des changements dans la morphologie cellulaire à l'accélération des cellules en présence de calcium (§ 4.1, 4.2, 4.3). Le résultat le plus remarquable est la mise en évidence d'un comportement quasiment périodique des protrusions et des rétractions (§ 4.2 et 4.3) dans des cellules sous contrainte. Ces protrusions et rétractions périodiques sont retrouvées chez des mutants (§ 4.4) et leur amplitude corrèle avec la vitesse cellulaire.

4.1 L'augmentation de $[Ca]_{ext}$ change la morphologie des cellules

Chez les cellules sauvages (AX2), l'augmentation de la vitesse instantanée moyenne des cellules (due à l'augmentation de la concentration de calcium) s'accompagne de changements morphologiques. Qualitativement, une observation des cellules en mouvement en microscopie en contraste de phase à fort grossissement (60x) montre que les protrusions sont plus longues et plus larges, et que les rétractions sont également plus efficaces (figure 4.1).

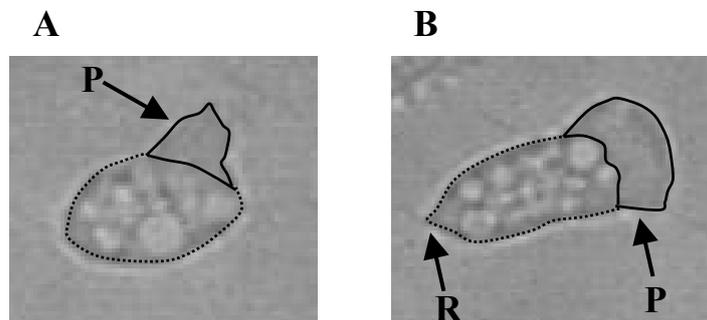


Fig 4.1 : A. Cellule AX2 en SB. B. La même cellule AX2 en SB + 1 mM de calcium. Les deux cellules sont soumises à une contrainte de 2,4 Pa. Les flèches montrent les protrusions du front avant (P) et la rétraction à l'arrière (R), que l'on voit mieux à 1 mM de calcium.

Nous avons expliqué dans la partie I, § 3.1.3, que l'augmentation brutale de la concentration de calcium à contrainte constante induisait une diminution transitoire de la vitesse des cellules. Morphologiquement, cela se traduit par une période d'inactivité de la cellule : pendant un court instant (quelques dizaines de secondes), la cellule s'arrondit et les bords cellulaires sont inactifs (ni rétractions ni protrusions, figure 4.2.B). Ensuite, l'activité cellulaire reprend de façon beaucoup plus dynamique et la cellule accélère.

Ces larges variations morphologiques suggèrent que le calcium extracellulaire entre dans la cellule et modifie, au moins transitoirement, la dynamique du cytosquelette d'actine.

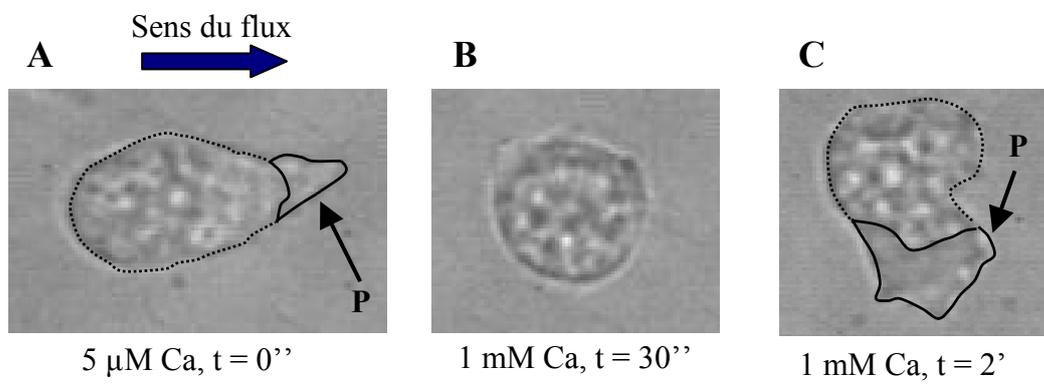


Fig 4.2 : A. Cellule AX2 en tampon SB (5 μM calcium) émettant une protrusion (flèche). B. La même cellule 30 secondes après l'arrivée de 1 mM de calcium. C. La même cellule deux minutes après émettant une large protrusion (flèche), 1 mM de calcium dans le tampon. La contrainte hydrodynamique vaut 2,4 Pa.

4.2 Première mise en évidence d'une périodicité dans la dynamique du bord cellulaire

Lors de ces expériences, nous avons repéré les pseudopodes émis et noté le temps écoulé entre chacun d'eux. Les résultats nous montrent que les cellules sauvages émettent parfois des pseudopodes de façon presque périodique. On voit par exemple sur la figure 4.3 que la cellule émet des pseudopodes régulièrement, avec une période de l'ordre de 10 secondes.

Nous verrons dans le paragraphe suivant que cette périodicité est observée de manière constante dans la dynamique des zones de contact, quels que soient le type cellulaire ou la concentration de calcium libre dans le tampon.

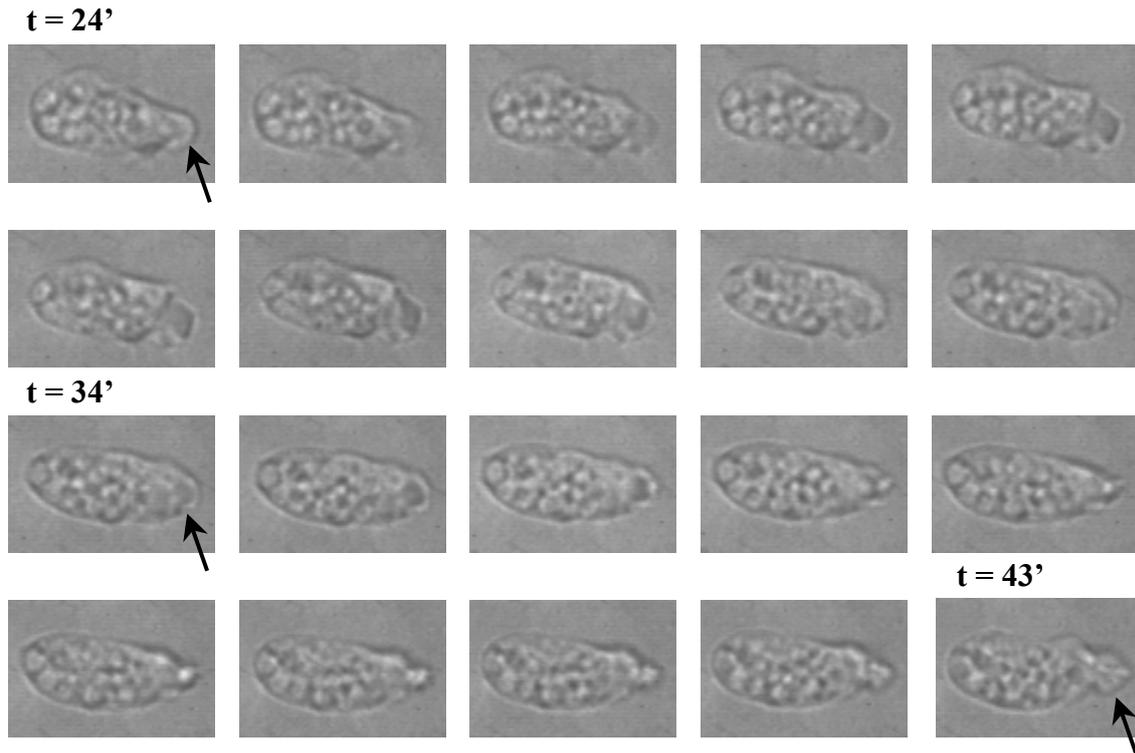


Fig 4.3 : Portion d'un film de 71 secondes montrant une cellule AX2 en présence de 1 mM de calcium soumise à une contrainte de 2,4 Pa. Les images sont centrées sur la cellule. Des pseudopodes sont émis à 24, 34 et 43 sec (flèches). D'autres pseudopodes apparaissent à $t = 0, 10, 55, 64$ et 71 secondes (non montrés).

4.3 Etude de la dynamique des zones de contact chez les cellules sauvages en fonction de $[Ca]_{ext}$

Pour mieux comprendre l'effet du calcium sur la motilité cellulaire, nous nous sommes intéressés aux bords cellulaire, sièges de la dynamique du mouvement. Nous avons vu qualitativement que les protrusions sont plus larges et les rétractions plus efficaces. Pour quantifier ces observations, nous nous sommes servi de la technique RICM pour visualiser les zones de contact, et sur les images obtenues, nous avons calculé les surfaces gagnées et perdues sur un intervalle de 3 secondes. Dans un premier temps, nous étudions des cellules sauvages AX2 soumises à une contrainte hydrodynamique constante de 2,4 Pa.

4.3.1 Mise en évidence de fluctuations périodiques dans le taux d'expansion et de contraction de l'aire de contact

Les expériences consistent à soumettre les cellules à un flux en observant la zone de contact avec le substrat par RICM (cf. Matériel et méthodes, § 2.4). Les expériences sont menées à différentes concentration de calcium libre, mais à contrainte constante ($\sigma = 2,4$ Pa). On laisse

les cellules s'adaptent au fluide avant d'appliquer la contrainte. Nous n'avons pas changé la concentration de calcium en cours d'expérience. Il faut observer les cellules sous une faible luminosité, en utilisant plusieurs filtres de densité optiques (0,75 % de la lumière émise par la raie à 550 nm de la lampe à mercure), sinon les cellules meurent et se décollent dans les deux minutes suivant le début de l'illumination.

Le centre de masse de la cellule se déplace globalement dans le sens de l'écoulement ($\pm 30^\circ$ par rapport à la direction du flux), par portions linéaires durant chacune environ une minute.

Les aires de contact observées sont en général en un seul morceau : la cellule gagne ou perd de la surface continûment. Parfois elle crée un nouveau point de contact et les deux surfaces se rejoignent rapidement. Ces aires de contact sont également fluctuantes : leur contour montre de nombreux avancées et reculs.

Pour analyser les aires de contact, on mesure la surface des pixels gagnés et perdus par la cellule entre deux instants successifs. La figure 4.4 définit ce qu'est une aire gagnée et une aire perdue entre deux images. Les taux d'expansion et de rétraction sont les aires des zones de contact gagnées ou perdues par unité de temps.

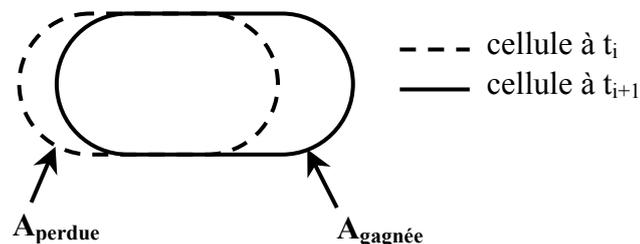


Fig 4.4 : Définition des aires gagnées et perdues de la cellule entre deux images. En divisant par $(t_{i+1} - t_i)$, on obtient les taux d'expansion et de rétraction.

Sur la figure 4.5, nous avons représenté les taux d'expansion et de rétraction des zones de contact pour trois cellules à trois concentrations de calcium différentes. Ces courbes confirment les observations en contraste de phase, les protrusions apparaissent de manière saccadée, chacun des pics représentant un évènement distinct. On définira les protrusions (respectivement les rétractions) comme les pics significatifs de la courbe d'expansion (respectivement de la courbe de rétraction). De même, le taux de contraction des zones de contact est irrégulier, les différents évènements étant également représentés par des pics de rétractions. Les pics sont clairement visibles, on peut donc définir une taille moyenne des pics et un intervalle de temps entre deux pics successifs. On négligera les pics dont la hauteur est

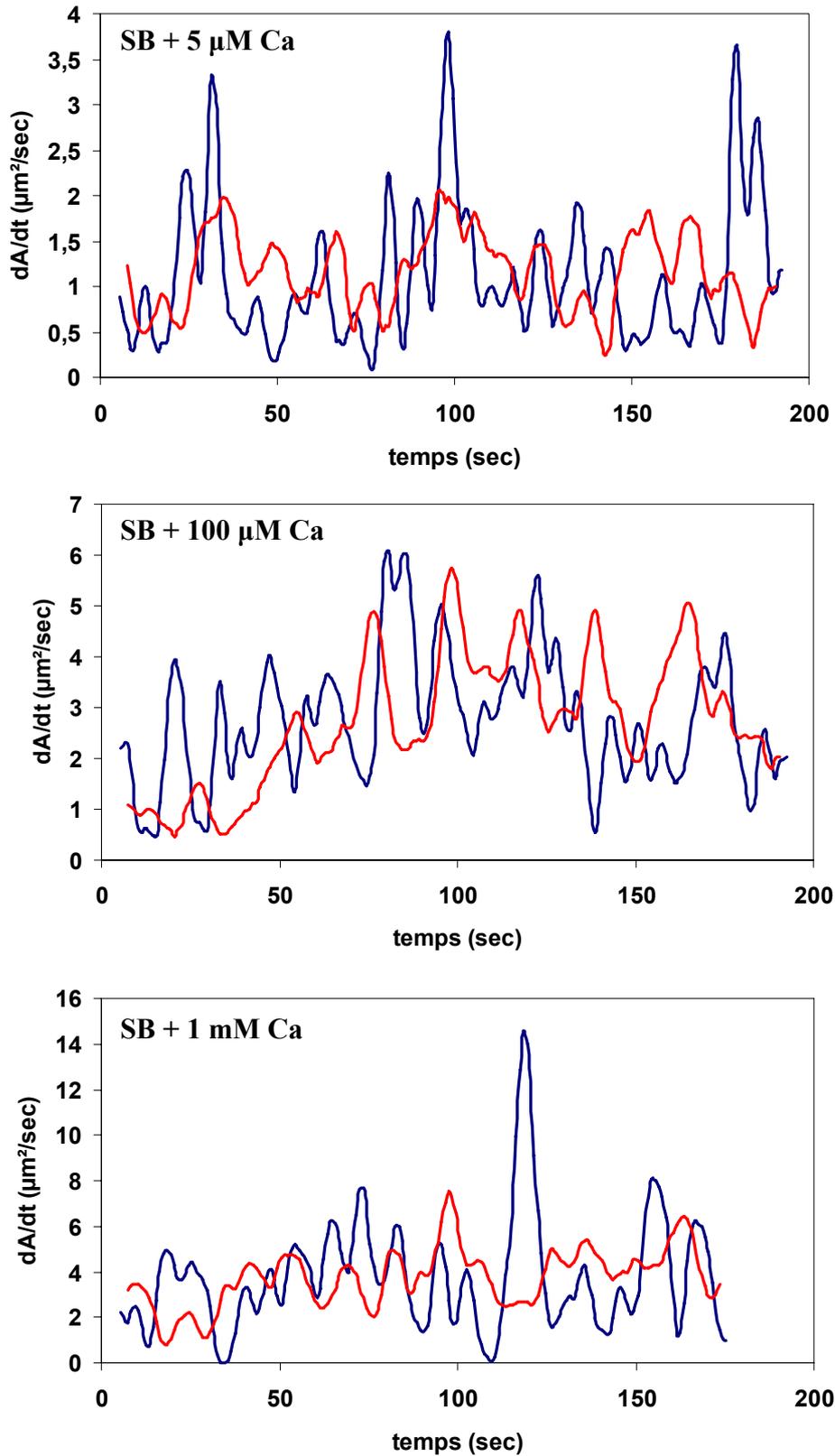


Fig 4.5 : taux d'expansion et de rétraction des zones de contacts pour trois cellules AX2 à trois concentrations de calcium différentes. Les protrusions et les rétractions de sont pas forcément en phase. La contrainte appliquée est constante et vaut 2.4 Pa. Noter les échelles différentes de ces trois enregistrements en ordonnée.

inférieure à $0,15 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (cf. Matériel et méthode, §2.4.3.3). Souvent, les pics apparaissent presque périodiques. Parfois, les protrusions sont en opposition de phase avec les rétractions, mais ce n'est pas toujours le cas (cf. $\text{Ca} = 5 \mu\text{M}$ et $t = 140\text{-}170 \text{ sec}$ de la figure 4.5).

On remarque que le calcium a un effet sur la taille des pics, donc sur la taille des protrusions et des rétractions. Nous l'avons mentionné qualitativement au § 4.1, nous allons maintenant décrire quantitativement ce phénomène.

4.3.2 Effet du calcium sur la taille des protrusions et rétractions

Pour chaque expérience, nous avons répertorié les pics des taux d'expansion et de rétractions. La valeur moyenne de ces pics de protrusions et de rétractions est représentée en fonction de la concentration de calcium libre donnée (figure 4.6). Elle augmente parallèlement pour les protrusions et les rétractions avec la concentration de calcium dans le tampon.

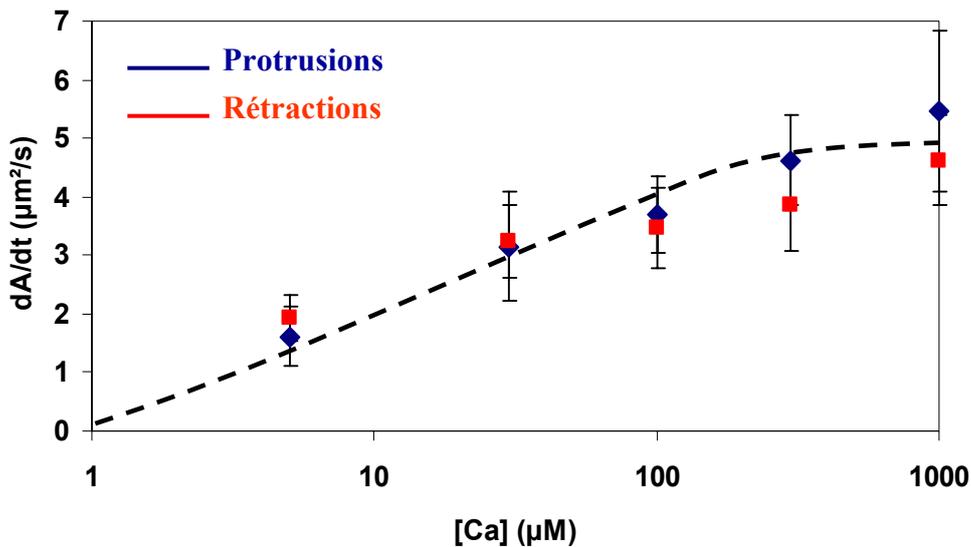


Fig 4.6 : Aires moyennes gagnées et perdues de cellules AX2 en mouvement en fonction de la concentration de calcium. $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$.

La courbe a pour équation $\frac{dA}{dt} = \left(\frac{dA}{dt} \right)_{\text{max}} \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Ca}^{2+}] + K_c}$. $K_c = 30 \mu\text{M}$.

L'affinité apparente vaut environ $30 \mu\text{M}$, la même que celle observée pour la vitesse instantanée moyenne des cellules. L'augmentation de motilité des cellules en présence de calcium est donc expliquée par l'augmentation de la taille des protrusions et des rétractions.

4.3.3 Effet du calcium sur la fréquence des protrusions et rétractions

Les deux paramètres permettant à la cellule d'accélérer sont la taille des protrusions et des rétractions, comme nous venons de le voir, mais également la fréquence d'apparition des ces dernières. Nous avons donc mesuré la période d'apparition des protrusions et des rétractions des cellules sauvages soumise à un flux (contrainte constante de 2,4 Pa), en fonction de la concentration de calcium (figure 4.7). La période est définie comme la valeur moyenne du temps séparant deux pics significatifs successifs des courbes de taux d'expansion ou de rétraction (pour le critère de choix des pics, cf. Matériel et méthode). Bien que l'erreur soit importante, on peut dire que la période d'émission des pseudopodes est de l'ordre de 9 secondes, et de 11 secondes pour les rétractions. Le calcium n'a pas d'effet sur cette période.

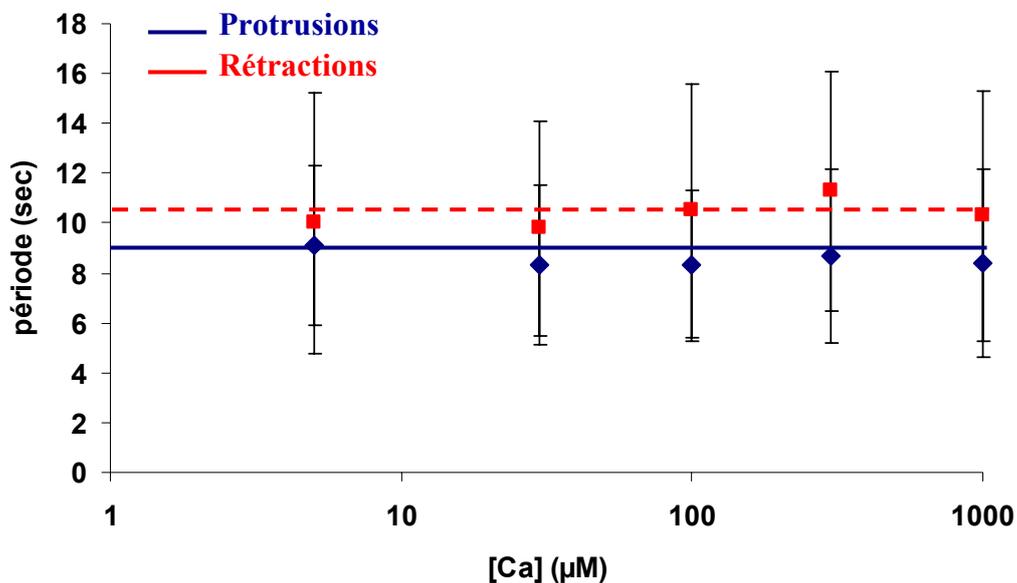


Fig 4.7 : Périodes des rétractions et protrusions de cellules sauvages en mouvement en fonction de la concentration de calcium libre. La contrainte est constante et vaut 2,4 Pa.

L'effet du calcium, sur les cellules sauvages, est donc de stimuler la dynamique des bords cellulaires, en jouant sur la taille des protrusions et des rétractions sans en modifier la période. La vitesse de la cellule est ainsi augmentée. Il faut noter qu'il y a une petite différence entre les périodes moyennes des protrusions et des rétractions. C'est pour cela que les pics de protrusions et de rétractions peuvent être tantôt en phase tantôt en opposition de phase.

4.4 Etude de la dynamique des zones de contact chez les mutants $R-IP_3\Delta$ et $G\beta\Delta$

Nous l'avons vu plus haut, ces mutants d'inactivation sont peu sensibles (cellules $R-IP_3\Delta$), voire insensibles (cellules $G\beta\Delta$) au calcium. Nous allons voir ce que cela signifie au niveau de la dynamique des bords cellulaire.

4.4.1 Effet de l'inactivation des gènes $G\beta$ et $ip1A$ sur la taille des protrusions et des rétractions

La représentation des taux d'expansion et de rétraction des cellules $G\beta\Delta$ et $R-IP_3\Delta$ (figure 4.8) présente, comme pour les cellules sauvages AX2, des fluctuations presque périodiques. Nous avons étudié pour ces deux mutants l'évolution de la taille des protrusions et des rétractions en fonction de la concentration de calcium, de la même façon que les cellules AX2. Nous montrerons dans le paragraphe suivant l'effet du calcium sur la période de ces protrusions et rétractions.

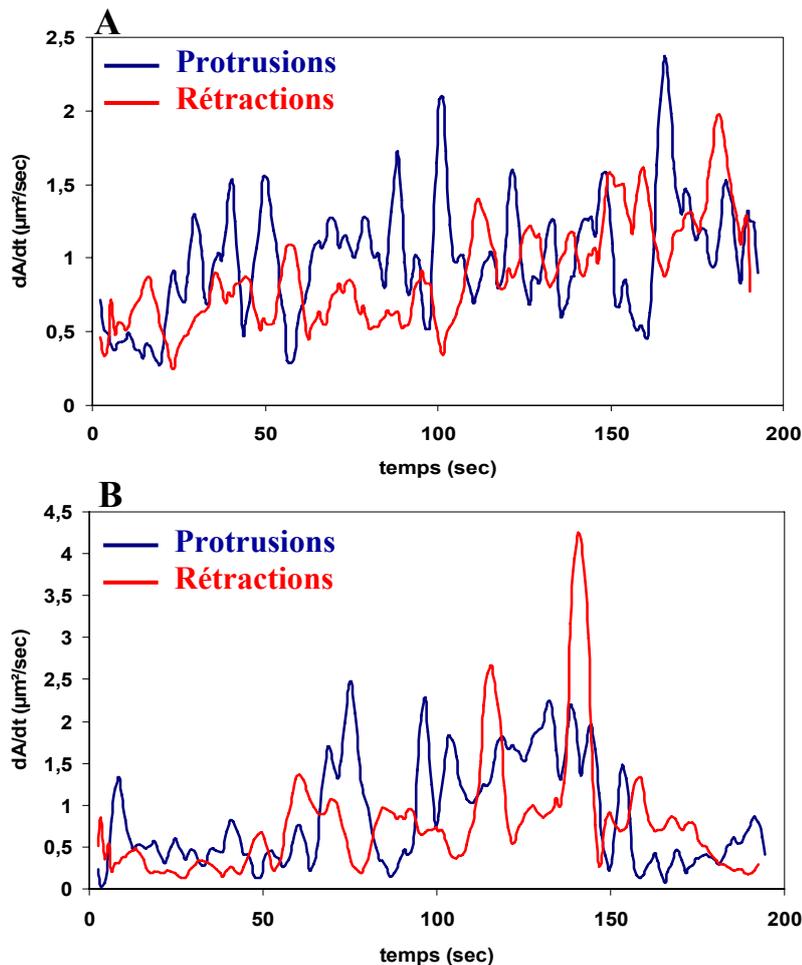


Fig 4.8 : taux d'expansion et de rétraction d'une cellule $G\beta\Delta$ (A) et d'une cellule $R-IP_3\Delta$ (B). La contrainte appliquée vaut 2,4 Pa, et la concentration de calcium libre vaut 5 μM .

La taille des protrusions et rétractions ne varie pas en fonction de la concentration de calcium pour les mutants nuls $G\beta\Delta$, comme le montre la figure 4.9.

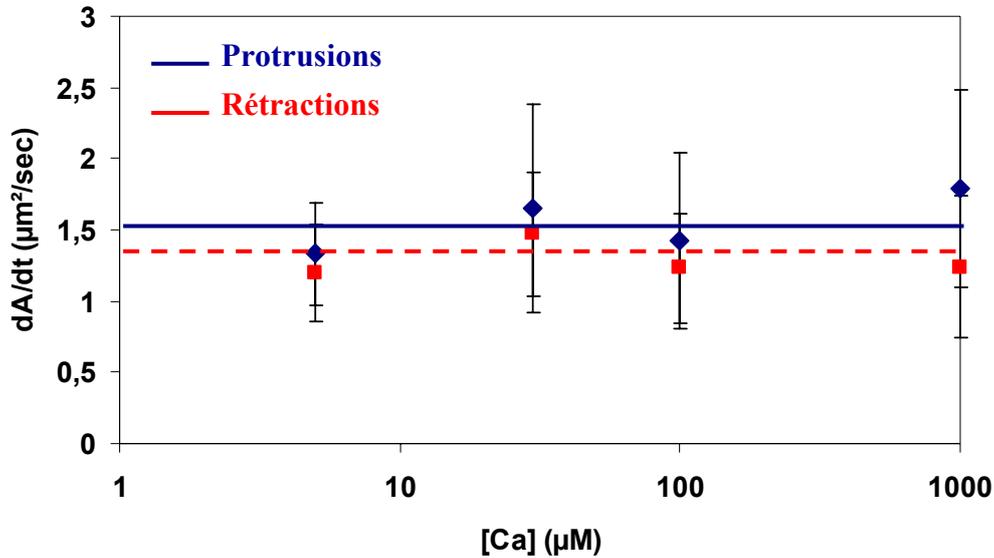


Fig 4.9 : Taille des protrusions et des rétractions en fonction de la concentration de calcium chez les mutants $G\beta\Delta$. $\sigma = 2,4 Pa$.

En revanche, chez les cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$, on voit que la taille des protrusions et des rétractions augmente avec la concentration de calcium libre au dessus de 100 μM (figure 4.10). On remarque cependant que les aires gagnées et perdues ne sont pas aussi importantes que pour la souche sauvage AX2. Nous avons remarqué (voir le paragraphe 3.2.1) que les mutants $G\beta\Delta+G\beta$ avaient une vitesse de base plus faible que le mutant nul $G\beta$. Cela se traduit au niveau des zones de contact par des protrusions et rétractions plus petites.

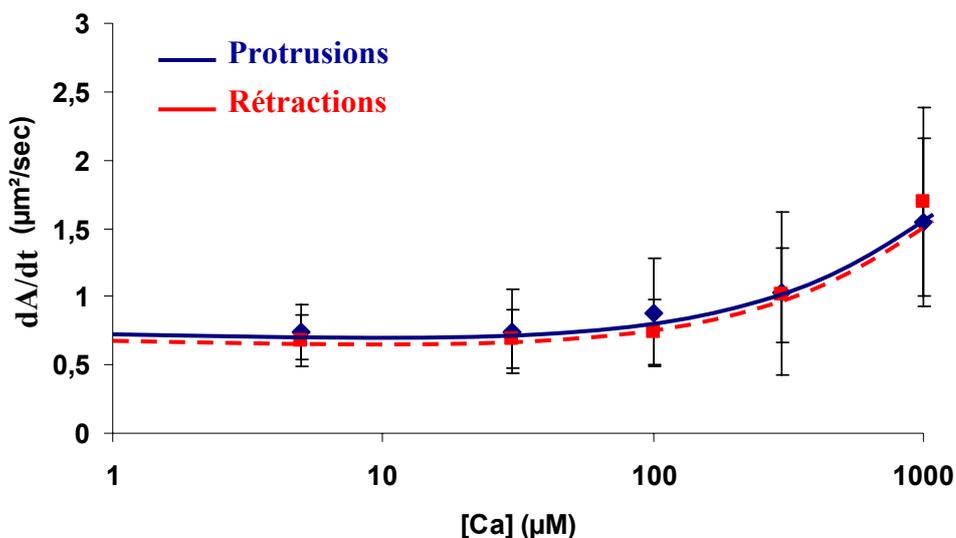


Fig 4.10 : Taille des protrusions et des rétractions des cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$ en fonction du calcium. $\sigma = 2,4 Pa$.

Ces résultats montrent que les protéines G jouent un rôle dans la dynamique des bords cellulaires, qui explique l'insensibilité au calcium de ces cellules.

Nous avons également étudié l'évolution des gains et pertes de surface par seconde des cellules R-IP₃Δ, en fonction de la concentration de calcium externe (figure 4.11). La taille des protrusions et des rétractions n'évolue que pour de fortes concentrations de calcium, au-delà de 600 μM. Ce résultat concorde avec le fait que la motilité sous flux de ces mutants est bien moins sensible au calcium que celle des cellules sauvages.

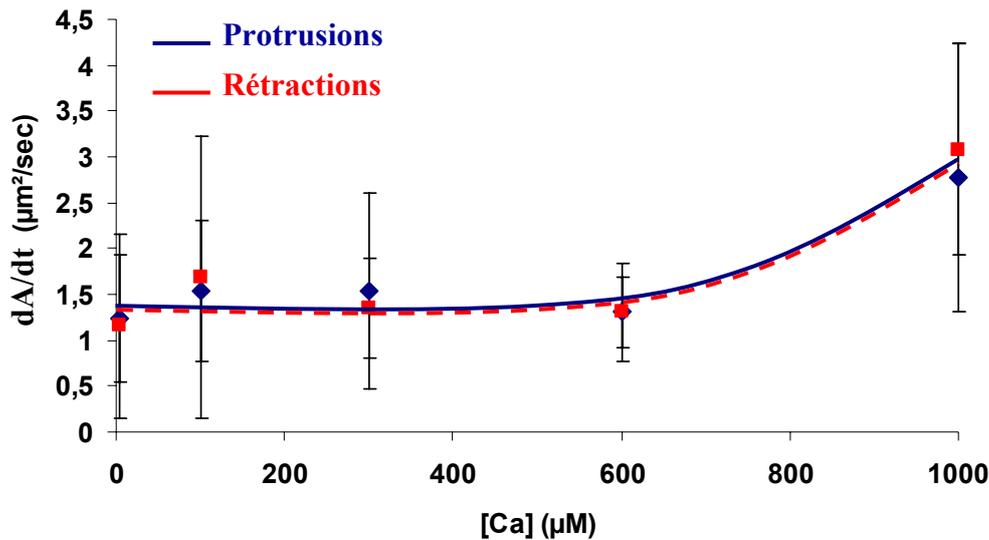


Fig 4.11 : Taille des protrusions et des rétractions des cellules mutantes R-IP₃Δ en fonction du calcium. $\sigma = 2,4 \text{ Pa}$.

4.4.2 Effet de l'inactivation des gènes Gβ et iplA sur la fréquence des protrusions et rétractions

La période des protrusions et des rétractions reste la même pour les mutants comme pour les cellules sauvages, quelle que soit la concentration de calcium externe (figure 4.12).

En conclusion, les protéines G hétérotrimériques et le récepteur à l'IP₃ sont impliqués dans la dynamique des bords cellulaires, mais ne sont pas responsables de l'apparition des protrusions et rétractions. De même, ces expériences confirment que les cellules GβΔ sont insensibles aux variations de la concentration de calcium dans le tampon. Les cellules dépourvues de récepteurs à l'IP₃ sont quand à elles beaucoup moins sensibles au calcium que les cellules sauvages. Ces récepteurs sont donc aussi nécessaires pour améliorer la sensibilité des cellules au calcium.

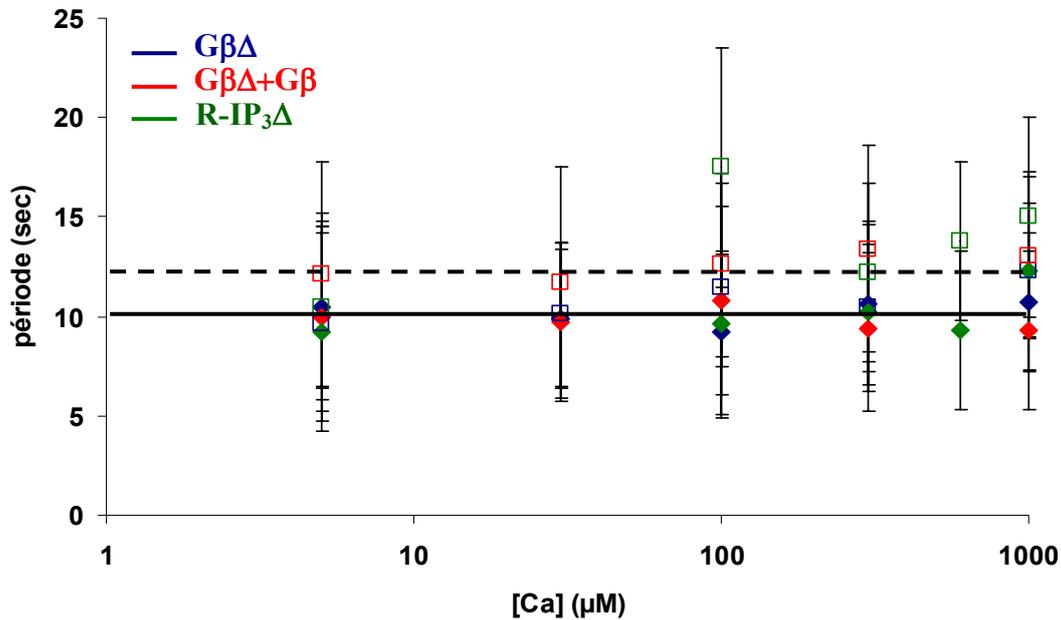


Fig 4.12 : Période des protrusions (losanges pleins) et des rétractions (carrés vides) pour les mutants $G\beta\Delta$, $G\beta\Delta+G\beta$, $R-IP_3\Delta$, en fonction de la concentration de calcium. $\sigma = 2,4 Pa$.

4.4.3 Taille et Périodicité des protrusions et rétractions en fonction de la vitesse cellulaire

Nous avons représenté la taille et la périodicité des protrusions et des rétractions en fonction de la vitesse cellulaire en incluant les données obtenues sur toutes les souches, pour pouvoir s'affranchir des paramètres comme la concentration de calcium libre et le type cellulaire. On n'a ainsi plus qu'une seule variable : la vitesse du centre de masse de la cellule.

Nous pouvons alors représenté la taille des protrusions et des rétractions en fonction de la vitesse cellulaire. Les points peuvent être ajustés par une fonction affine (figure 4.13)

$$\frac{dA}{dt} = 0,9.v + 0,85$$

où dA/dt est la valeur moyenne des pics de protrusions et de rétractions.

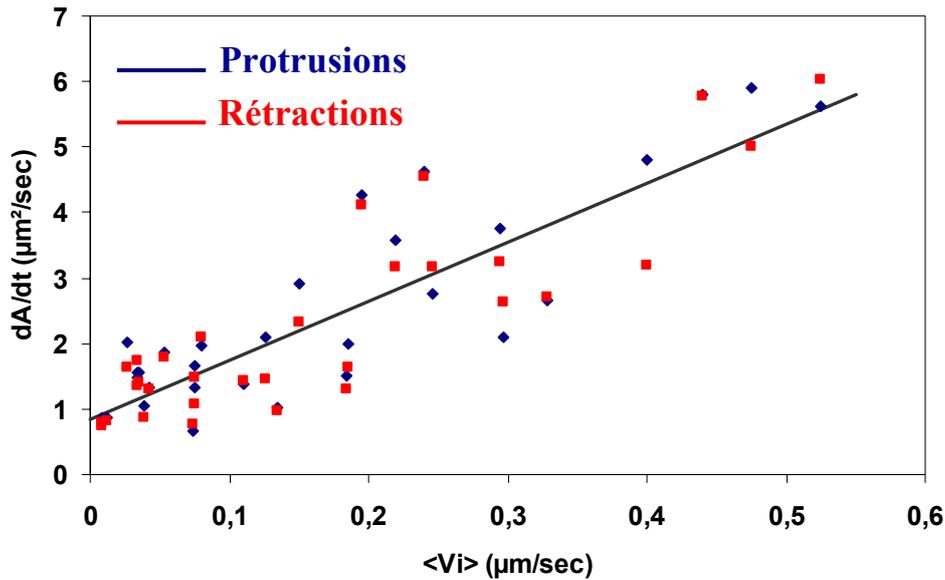


Fig 4.13 : Evolution de la taille des rétractions et des protrusions en fonction de la vitesse des cellules, quel que soit le type cellulaire et la concentration de calcium libre. L'équation de la courbe de tendance est $0,9.v + 0,85$.

La période des protrusions et rétractions ne varie pas en fonction de la vitesse des cellules (figure 4.14), et ce quel que soit le type cellulaire ou les paramètres extérieurs.

Mais est-ce que les périodes des protrusions et des rétractions sont les mêmes ? La période des protrusions vaut $9,8 \pm 0,9$ secondes et celle des rétractions vaut $12,5 \pm 1,9$ secondes. Lorsque l'écart type est important, la distribution de Student permet de comparer deux échantillons ayant respectivement pour moyennes et écarts-types \bar{X}_1 , \bar{X}_2 , s_1 et s_2 (R. Murray, théorie et applications de la statistique pages 188-195)

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad \text{où} \quad \sigma = \sqrt{\frac{N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

N_i est le degré de liberté de l'échantillon i (dans notre cas le nombre de mesures, $i = 2$ pour les protrusions et $i = 1$ pour les rétractions).

t vaut 6,92, et d'après la table de la distribution de Student à 30 degrés de liberté, on peut dire que les deux distributions ont plus 99 % de chances d'être différentes. Il est donc certain que la période des protrusions est différente de la période des rétractions.

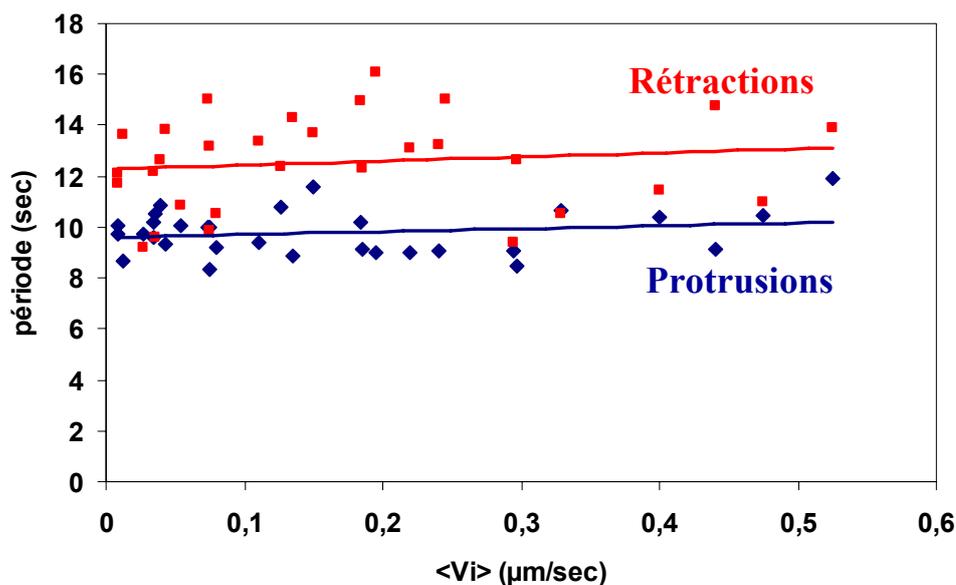


Fig 4.14 : Evolution de la période des rétractions et des protrusions en fonction de la vitesse des cellules, quel que soit le type cellulaire et la concentration de calcium libre. On observe une très légère augmentation avec V_i .

Pour tous les types cellulaires, on observe une corrélation entre la vitesse sous flux et la taille des protrusions et des rétractions, mais aucune entre la vitesse sous flux et la période des protrusions et des rétractions. On peut donc dire que l'évolution de la motilité cellulaire en fonction du calcium à contrainte constante dépend uniquement de la taille des protrusions et des rétractions.

Chez *Dictyostelium discoideum* l'augmentation de la vitesse cellulaire s'explique donc par un accroissement de la taille des protrusions et des rétractions à période constante.

5 PARTIE III : Evolution de la zone de contact cellule-substrat en fonction du temps au cours de l'étalement cellulaire

La cellule avance sur le substrat grâce entre autre à l'émission de pseudopodes qui exercent des forces sur la surface. Ces forces ne peuvent être exercées que si la cellule s'étale et adhère sur le substrat. Nous avons donc conçu une situation expérimentale simple qui reconstitue ce phénomène presque exclusivement.

Nous présentons d'abord les résultats des expériences d'étalement cellulaire obtenus sur des cellules sauvages AX2, et montrons l'importance de la polymérisation de l'actine dans le processus d'étalement. Nous présenterons ensuite un modèle physique succinct de l'étalement cellulaire réalisé par François Chamaroux et Bertrand Fourcade, en énumérant les paramètres physico-chimiques permettant de modéliser l'étalement cellulaire, dans des cas simples.

Nous montrerons finalement que les effets du calcium extracellulaire et de l'inactivation de gènes sur le mouvement cellulaire induit par un flux se retrouvent au niveau de l'étalement cellulaire.

5.1 Analyse qualitative

Nous étudions ici l'étalement des cellules sauvages AX2 resuspendues en tampon SB sur lamelle de verre : la concentration de calcium libre externe est de 5 μM . On observe par RICM la surface de contact des cellules sauvages durant l'étalement.

Quand la cellule commence à s'étaler, on voit apparaître sur l'image un point sombre : c'est le premier contact cellule-substrat (figure 5.1). Il apparaît parfois un deuxième point de contact au début de l'étalement, mais on prendra l'origine des temps au moment du premier contact entre la cellule et la surface de verre. La croissance de la surface de contact n'est pas un phénomène isotrope, sauf pendant les quelques secondes qui suivent le premier point de contact. La cellule s'étale dans plusieurs directions précises, successivement ou en même temps. Autour de cette direction, l'étalement est compris dans un angle de 30° environ. Sur la figure, 5.1, la surface croît à partir de deux points de contact ; la cellule s'étale dans une première direction pour $0 < t < 18$ secondes, et dans une autre direction pour $27 < t < 69$. Les expériences montrent que les cellules mettent en moyenne entre 50 et 100 secondes pour atteindre l'aire maximale. Quand la surface n'évolue presque plus, la cellule devient motile : elle se dirige souvent dans la dernière direction prise par la cellule lors de l'étalement.

L'émission de pseudopodes devient plus localisée et les rétractions apparaissent. Cette phase de mouvement correspond à $78 < t < 120$ sur la figure 5.1.

Deux cellules ne s'étalent jamais de la même façon, cependant nous pouvons classer l'étalement cellulaire en différents cas que nous exposerons plus tard dans ce paragraphe.

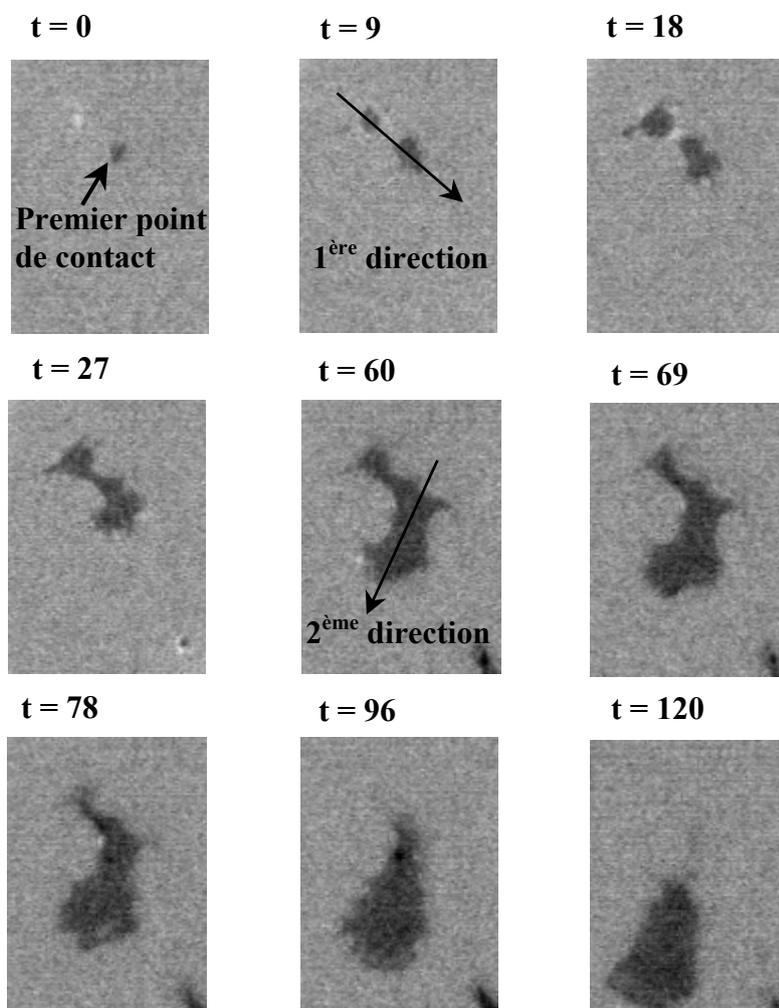


Fig 5.1 : *Etalement d'une cellule sauvage AX2 en fonction du temps. On observe une phase de croissance, où la cellule s'étale successivement dans deux directions (flèches), suivie d'une phase de mouvement sur les trois dernières images. Le temps est en secondes.*

Nous nous sommes d'abord intéressé à l'évolution de l'aire totale $A(t)$ de la cellule durant l'étalement cellulaire, pour observer quantitativement la phase de croissance et la phase de mouvement. Nous avons donc mesuré l'aire de la surface totale cellule-substrat en fonction du temps (cf. Matériel et méthodes, § 2.6) et représenté celle-ci sur un graphe (figure 5.2).

D'une manière générale, on peut définir un domaine de croissance plus ou moins linéaire puis une phase de saturation où la surface cellulaire reste à peu près constante (à 10 %

près). Cela correspond bien aux observations qualitatives que nous avons fait de l'étalement cellulaire.

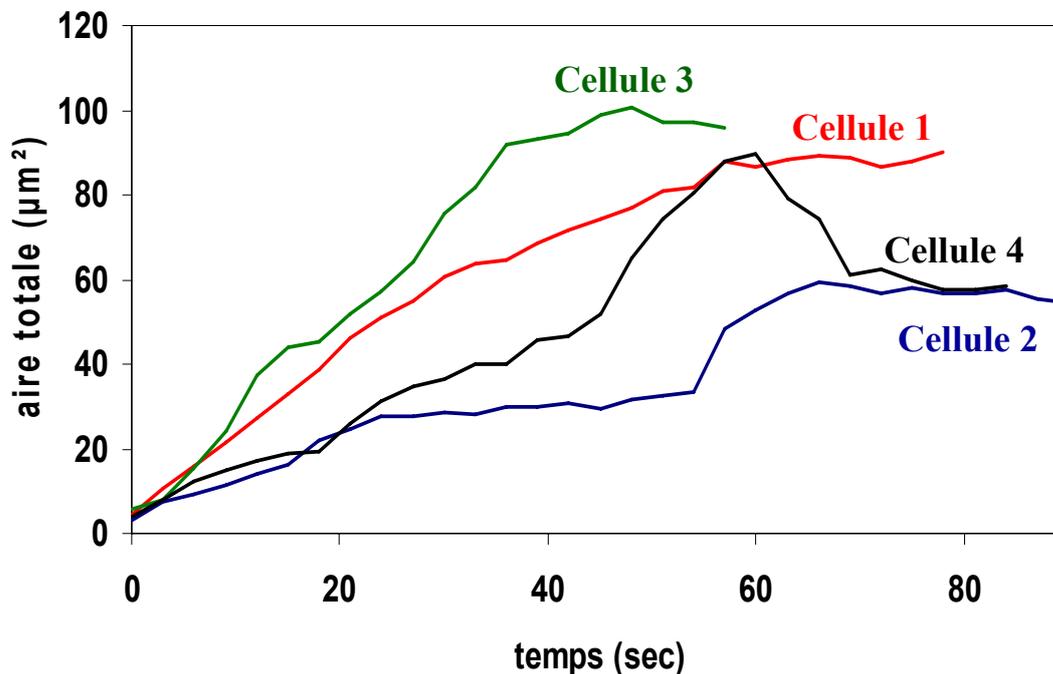


Fig 5.2 : Étalement de 4 cellules AX2 en fonction du temps sur du verre, en tampon SB.

Toutes les cellules ne s'étalement pas de la même façon, et l'étude cumulée des films d'étalement et des courbes d'évolution de la surface de contact totale cellule-substrat correspondantes nous ont permis de différencier quatre cas lors de l'étalement cellulaire :

- La phase de croissance est continue, la courbe d'étalement est en un seul morceau, quasiment linéaire. Qualitativement, l'étalement de la cellule est régulier et quasiment monotone (figure 5, cellule 1).
- La phase de croissance est discontinue, on voit que la courbe d'étalement est en plusieurs morceaux. Qualitativement, l'étalement de la cellule est saccadé, alterne entre des phases rapides et des phases plus lentes, très (figure 5, cellule2) ou peu (figure 5, cellule 3) marquées.
- Parfois, on observe un phénomène d'overshoot à la fin de la phase de croissance. On a une diminution de la surface de contact à la fin de l'étalement. Qualitativement, on voit la rétraction d'un bord cellulaire juste avant que la cellule devienne motile (figure 5.2, cellule 4).

Il arrive qu'à la fin de la phase de croissance, la cellule reste immobile, et cela est valable pour les trois cas précédemment cités. On n'observera ni protrusions ni rétractions après l'étalement.

Nous avons voulu connaître les taux d'expansion et de rétraction en fonction du temps lors de l'étalement cellulaire, dans le but de mieux dissocier les phases de croissance et de mouvement (existe-t-il un phénomène d'étalement pur ?), de chercher une éventuelle périodicité dans l'étalement, et de différencier les différents cas observés en terme d'émission de protrusions et de rétractions. Pour cela, on utilise le même programme que pour le traitement de l'évolution des zones de contact lors de la motilité sous flux (§ 4.3 et 4.4). Il génère des films tricolores montrant les zones de protrusions (bleues), de rétractions (rouges), et constantes (vertes), et nous analyserons les courbes de taux d'expansion et de rétraction en fonction du temps (cf. Matériel et méthode, § 2.4.3).

- Cas de l'étalement régulier

On voit sur la figure 5.3 une suite d'images venant du film d'étalement en trois couleurs d'une cellule AX2.

Ces films montrent bien qu'il y a une phase de croissance pure ($t < 90$ secondes), où les rétractions sont très rares voire inexistantes, et une phase de mouvement, où la cellule émet des pseudopodes plus localisés, tandis que des rétractions apparaissent. La courbe d'aire totale $A(t)$ (figure 5.4) montre un étalement très régulier de cette cellule, de 0 à 140 secondes.

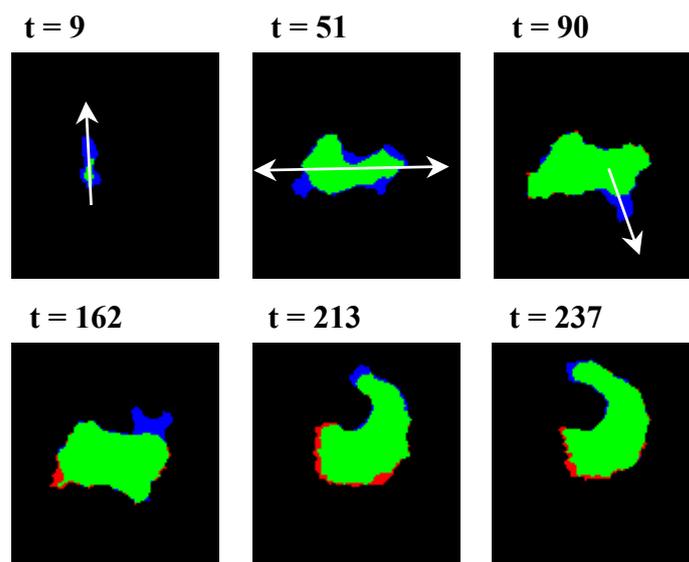


Fig 5.3 : Images tricolores montrant une cellule AX2 en train de s'étaler. Les parties bleues représentent le taux d'expansion, les rouges le taux de rétraction, et les vertes les parties invariantes. Pour $0 < t < 90$, la cellule ne fait que s'étaler, et pour $90 < t < 237$, il y a des rétractions et la cellule est en mouvement. t est en secondes. Les flèches indiquent les directions principales d'étalement suivies par la cellule.

Les graphes des taux d'expansion et de rétraction (figure 5.4) confirment les observations de la figure 5.3.

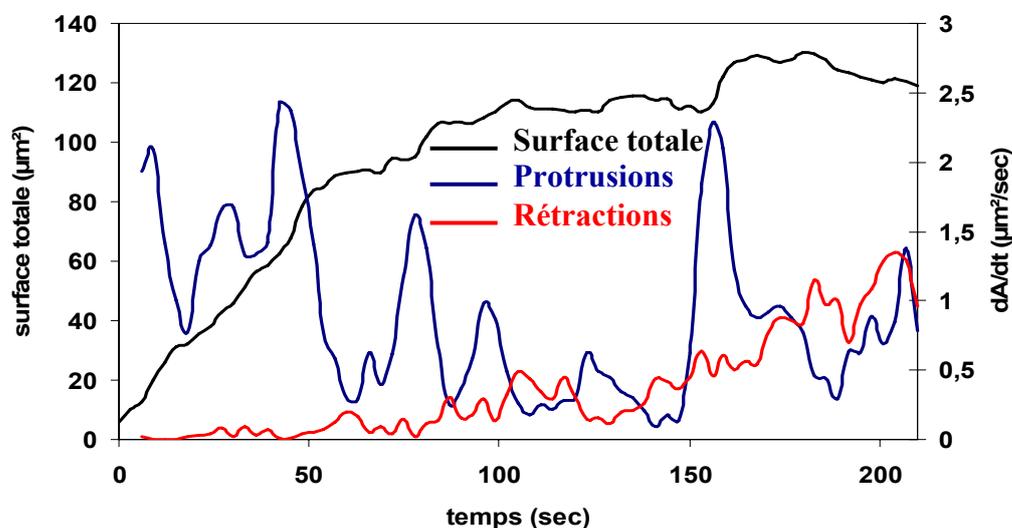


Fig 5.4 : Représentation des taux d'expansion et de contraction et de l'évolution de la surface de contact d'une cellule AX2 en train de s'étaler. Les résultats de la figure 5.3 et 5.4 correspondent à la même expérience.

Au début de l'étalement, le taux d'expansion est très supérieur au taux de rétraction. La cellule émet des pseudopodes à $t = 12, 25, 40, 80, 90$ et quasiment aucune rétraction pendant la première minute. La cellule devient motile vers $t = 140$, au moment où le taux de rétraction devient comparable au taux d'expansion. Dans la phase de croissance, il y a trois pics principaux dans la représentation du taux d'expansion à $t = 12, 40$ et 80 . Ces pics correspondent à la présence de plusieurs protrusions lors de l'étalement, et peuvent également permettre de repérer les changements de directions prises par la cellule durant l'étalement.

- Cas de l'étalement irrégulier

On voit sur la figure 5.5 une suite d'images en trois couleurs venant du film d'étalement d'une cellule AX2. L'étalement est irrégulier, on distingue clairement deux événements successifs d'étalement lors de la phase de croissance.

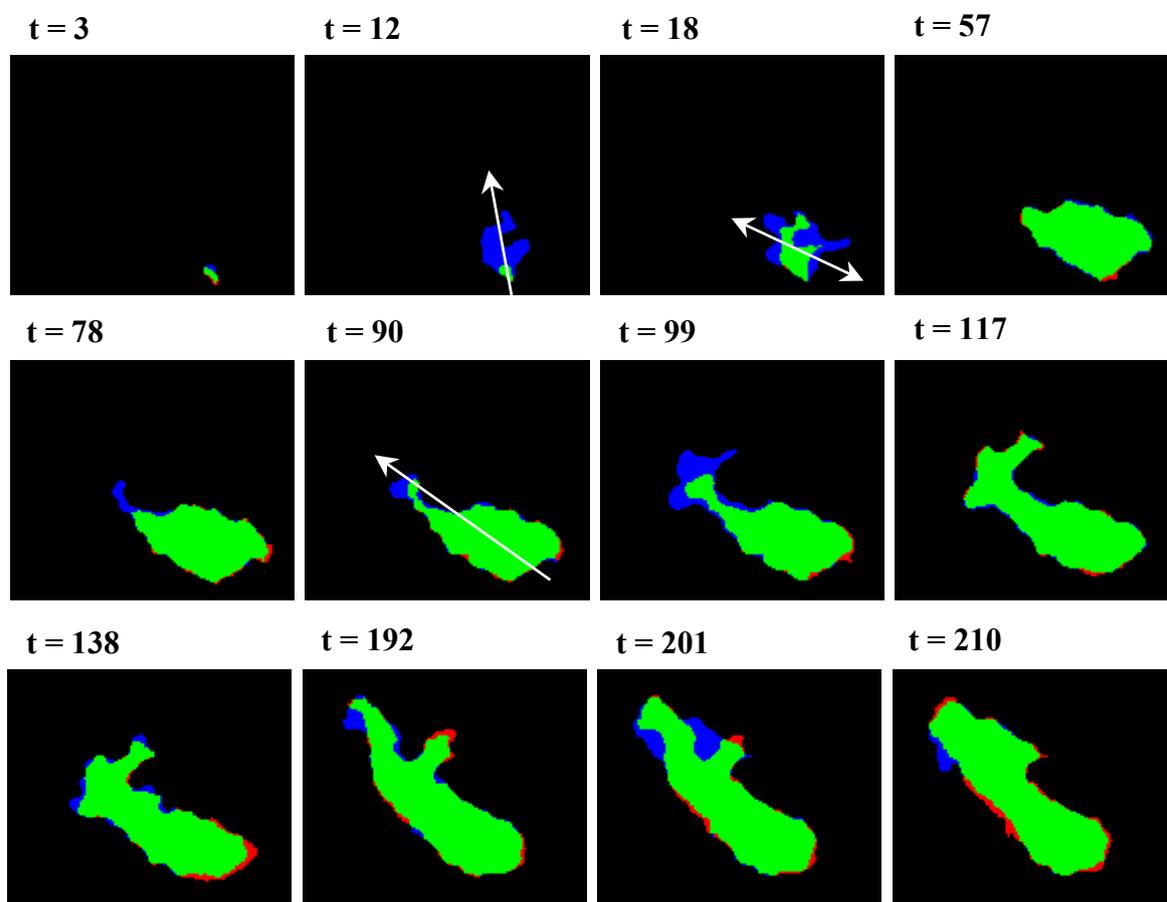


Fig 5.5 : *Étalement d'une cellule AX2. On distingue deux événements dans la phase de croissance entre $3 < t < 57$ et entre $78 < t < 117$. Entre $138 < t < 210$, les rétractions apparaissent, la cellule est motile. Le temps est en secondes. Les flèches représentent les directions privilégiées d'étalement pendant la phase de croissance.*

Le premier événement s'arrête vers $t = 57$ secondes, on voit qu'il n'y a plus d'évolution de la surface de contact pendant 20 secondes. Puis la cellule s'étale à nouveau entre $78 < t < 117$. Elle devient motile pour $t > 138$ secondes.

Ces observations sont confirmées par le graphe des taux d'expansion et de rétraction superposés avec l'évolution de l'aire de contact en fonction du temps (figure 5.6).

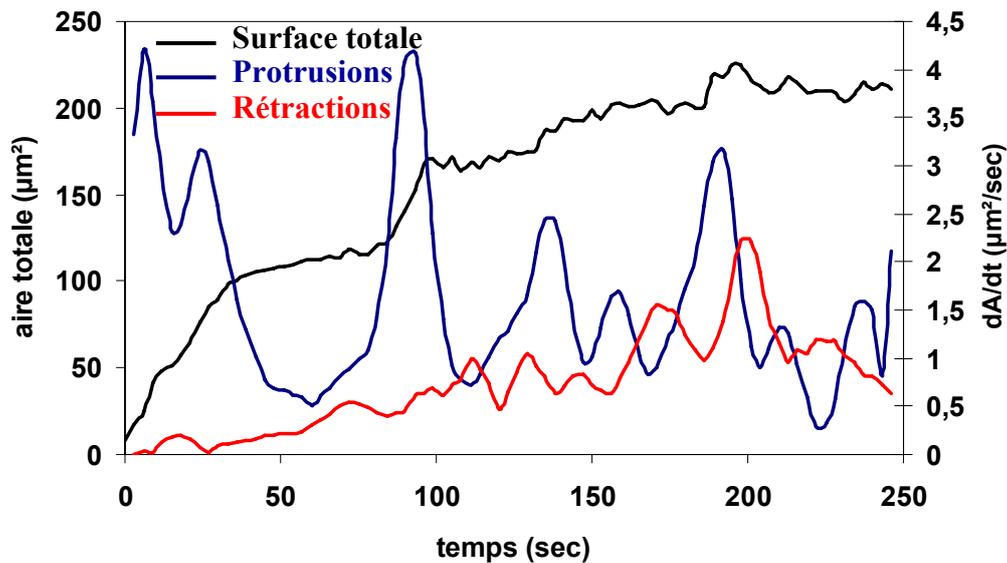


Fig 5.6 : Représentation des taux d'expansion et de contraction et de l'évolution de la surface de contact d'une cellule AX2 en train de s'étaler. On distingue bien les deux évènements distincts lors de la phase de croissance ($t < 140$ secondes). Les résultats de la figure 5.5 et 5.6 correspondent à la même expérience .

Pour $t < 140$ secondes, le taux de rétraction est inférieur en moyenne au taux d'expansion. Il s'agit bien de la phase de croissance. Elle est divisée en deux phases, et à chaque groupe de pics de la représentation du taux d'expansion correspond une direction d'étalement. La première phase est constituée de deux pics car la cellule émet deux protrusions, puisqu'elle s'étale dans deux directions. La deuxième phase ne comprend qu'un seul pic et la cellule ne s'étale que dans une seule direction (émission d'une seule protrusion). Puis pour $t > 140$ secondes, les taux d'expansion et de contraction moyens sont comparables, la cellule est en mouvement. On peut noter sur la figure 5.6 que dans la période 150-220 secondes, les protrusions et les rétractions fluctuent d'une manière presque périodique en opposition de phase. Ce comportement est souvent observé pour des cellules motiles à contrainte hydrodynamique appliquée nulle.

- Cas de l'overshoot

Ce dernier cas est le plus rare, on le remarque sur certaines cellules : à la fin de la phase de croissance, il y a une rétraction qui suit une protrusion. Il y a un phénomène de recul de la zone de contact (figure 5.7).

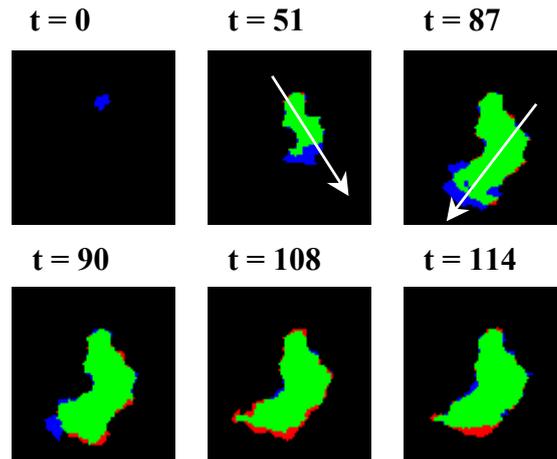


Fig 5.7 : Cellule AX2 en train de s'étaler. Il y a un phénomène d'overshoot qui se caractérise à $90 < t < 114$ par une rétraction du bord cellulaire. Les flèches indiquent les deux directions prises par la cellule pendant l'étalement. t en sec.

L'overshoot se distingue des cas précédents car il correspond à une contraction qui a lieu sur une zone précédemment en phase d'étalement. On peut détailler l'étalement de cette cellule en exploitant les courbes de taux d'expansion et de rétraction, ainsi que la courbe d'évolution de la surface de contact en fonction du temps (figure 5.8).

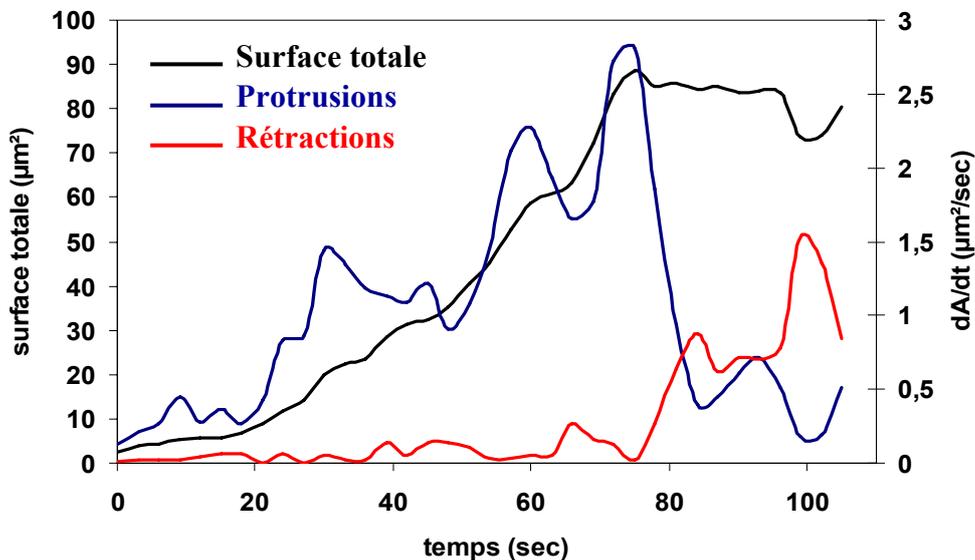


Fig 5.8 : Représentation des taux d'expansion et de contraction et de l'évolution de la surface de contact d'une cellule AX2 en train de s'étaler. On distingue le phénomène d'overshoot à la fin : le taux de rétraction est plus important que le taux d'expansion. Les résultats de la figure 5.7 et 5.8 correspondent à la même expérience.

Là encore, les pics correspondent à des directions de l'étalement distinctes durant la phase de croissance : un groupe de pics à $20 < t < 50$ secondes et un autre groupe à $50 < t < 80$ secondes. A partir de $t = 80$ secondes, la surface totale diminue brusquement de $4 \mu\text{m}^2$, puis se stabilise, et

de nouveau diminue brusquement à $t = 100$ secondes. Ces deux événements traduisent une forte diminution du taux d'expansion couplée à une forte augmentation du taux de rétraction. On est donc dans la situation où il n'y a plus de protrusions, presque uniquement des rétractions.

La cellule présentée sur la figure 5.7 et 5.8 présente une autre particularité : la phase de croissance n'est linéaire qu'à partir de 20 secondes après le premier point de contact. Avant cela, l'aire de contact évolue très lentement. Cette latence est observée que l'étalement ultérieur soit régulier ou non. Cela montre qu'il peut y avoir un temps entre le premier point de contact et le démarrage de l'étalement cellulaire.

- Cas de cellules immobiles.

Ce cas peut s'appliquer au trois cas précédemment cités. Il est caractérisé par une phase de mouvement très réduite après l'étalement (figure 5.9).

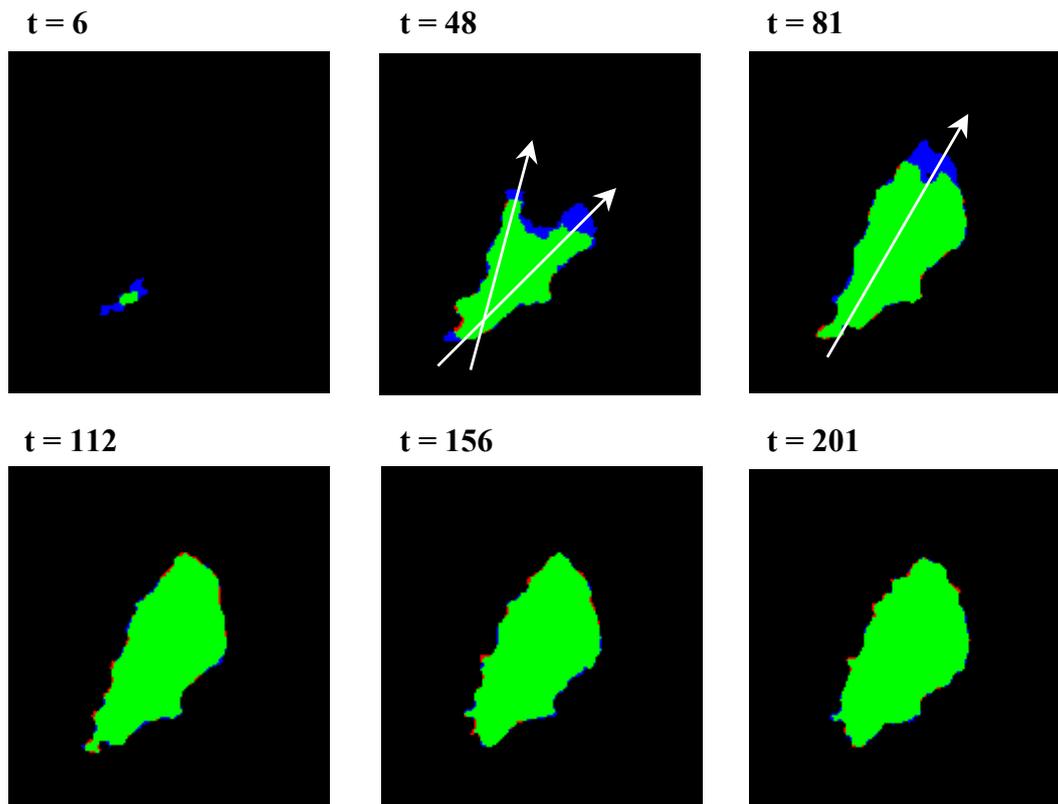


Fig 5.9 : Cellule AX2 en étalement. Passées 80 secondes, la surface de la cellule n'évolue presque plus. Les flèches indiquent les directions prises par la cellule lors de la phase de croissance. Le temps est exprimé en secondes.

On voit que pour $t > 81$ secondes, on observe uniquement quelques fluctuations de la zone de contact. Ceci se retrouve sur les graphes des taux d'expansion et de rétraction, et de surface totale (figure 5.10). Il y a un fort taux d'expansion pendant la phase de croissance, donc de l'étalement pur. Parallèlement, la surface totale augmente. A la fin de la phase de croissance, la surface n'évolue presque plus, et le taux d'expansion tombe à un niveau très bas, semblable au taux de rétraction.

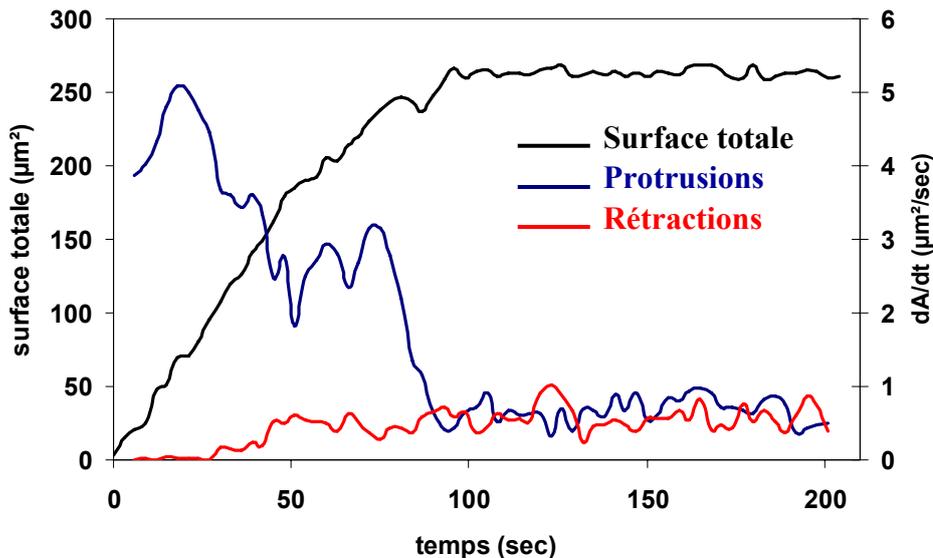


Fig 5.10 : Représentation des taux d'expansion et de contraction et de l'évolution de la surface de contact d'une cellule AX2 en train de s'étaler. Passées 80 secondes, l'activité de la cellule est quasi inexistante. Les résultats de la figure 5.9 et 5.10 correspondent à la même expérience.

Les deux groupes de pics de part et d'autre de $t = 50$ secondes sont dus à la présence de deux protrusions émises à $t = 6$ et $t = 48$ secondes qui se rejoignent lors de la phase de croissance (voir $t = 48$ et $t = 81$ de la figure 5.9).

La représentation des taux d'expansion et de rétraction et de l'aire totale des zones de contact de cellules en étalement nous permettent de différencier l'étalement pur de la motilité : la cellule devient motile quand $\langle P(t) \rangle \approx \langle R(t) \rangle$. On peut également séparer les cas réguliers (étalement en une seule fois) des cas irréguliers (étalement en plusieurs évènements, plusieurs portions régulières). Dans une portion régulière, on peut repérer des fluctuations lors de la phase de croissance (accélération et décélération localisées). Ces fluctuations se retrouvent dans la représentation du taux d'expansion, où chaque pic correspond à un évènement. Chaque pic représente une protrusion, et plus les pics sont distants, plus les protrusions sont éloignées dans le temps et l'espace. On peut ainsi également détecter les

changements de direction en analysant le taux d'expansion. A noter que l'aire de la surface des zones de contact cellule-substrat est très variable d'une cellule à l'autre.

5.2 Analyse quantitative

Pour s'affranchir de ces variations de surface entre cellules, on peut dans un premier temps représenter l'évolution de la surface de contact moyenne en fonction du temps (figure 5.11).

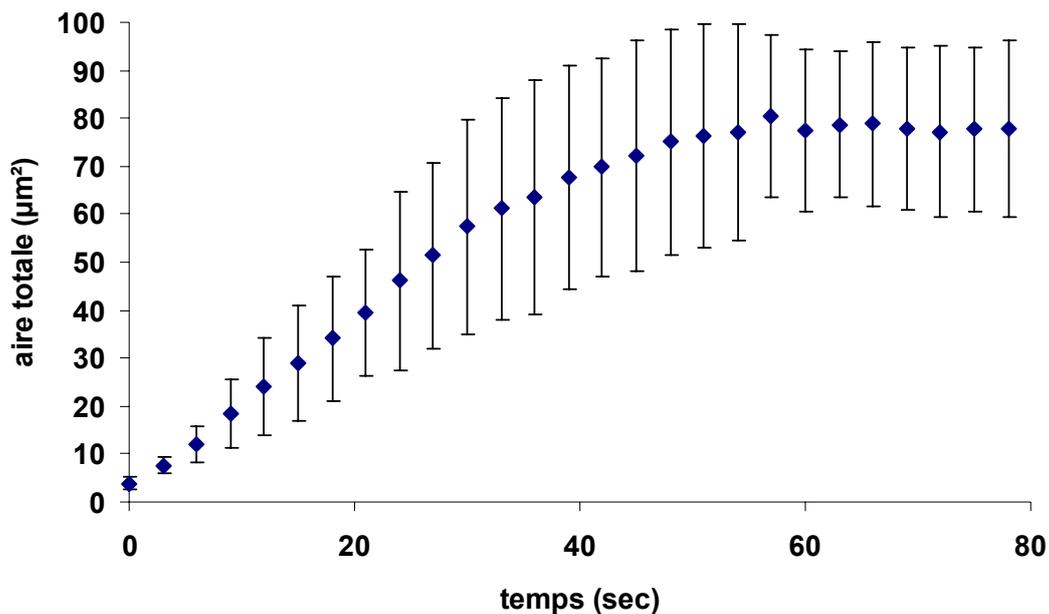


Fig 5.11 : *Étalement moyen en tampon SB des cellules sauvages AX2 en fonction du temps. La moyenne est faite sur sept cellules.*

Si on moyenne l'étalement cellulaire de plusieurs cellules (entre cinq et dix), la courbe d'étalement à l'allure des courbes de cas dits réguliers : une phase de croissance quasiment linéaire qui dure environ 60 secondes, et une phase où l'aire de la surface de contact n'évolue plus. Ceci montre que l'étalement cellulaire est en moyenne régulier, mais la plupart du temps viennent s'ajouter des phénomènes erratiques, que nous avons décrits plus haut.

Les cas réguliers peuvent être ajustés par un modèle physique développé par François Chamaraux et Bertrand Fourcade (Chamaraux et al., 2005).

Ce modèle montre que l'aire de contact normalisée (c'est-à-dire $A(t)/A_{\infty}$) est une fonction du temps, avec un facteur d'échelle α qui est une constante de temps. La cinétique de l'étalement

est contrôlée par l'attachement du cytosquelette d'actine à la membrane, au niveau de la ceinture adhésive, c'est-à-dire à la limite de la zone de contact (voir figure 5.12). Le modèle couple la cinétique de la polymérisation et de la dépolymérisation d'actine à la tension membranaire τ .

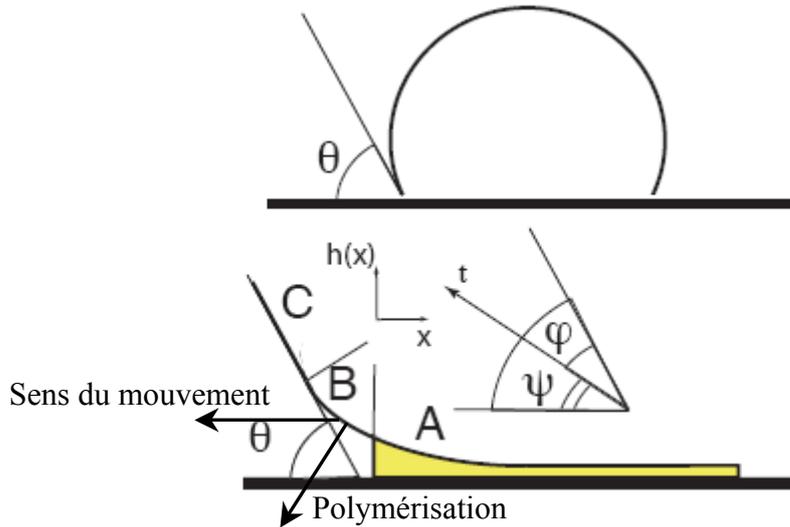


Fig 5.12 : vue schématique d'une cellule adhérent sur un substrat. La figure du haut définit l'angle de contact macroscopique θ . Celle du bas représente la limite de la zone de contact. Dans les zones A et C, le cytosquelette est attaché à la membrane, contrairement à la zone B, où la membrane est libre.

Lorsque la cellule s'étale, la tension membranaire et l'angle macroscopique θ augmente, et le taux de polymérisation diminue progressivement au profit du taux de dépolymérisation. Appelons ces vitesses de polymérisation et de dépolymérisation V_+ et V_- . Elles dépendent de la tension membranaire. La force conductrice de l'étalement est la polymérisation d'actine, et est localisée au bord de la zone de contact (jonction A-B). On a

$$\frac{d\theta}{dt} \propto \frac{1}{\theta} [V_+[\tau(\theta)] - V_-[\tau(\theta)]] \quad (1)$$

Avec

$$\tau(\theta) = \tau_0 + C\theta^\beta \quad (2)$$

τ_0 étant le tension membranaire initiale. La cellule est étalée lorsque les vitesses V_+ et V_- sont équivalentes. La tension membranaire vaut dans ce cas τ_{\max} .

Lors de l'étalement, les variations de la tension membranaire sont très faibles, de sorte que

$$\frac{\tau_{\max} - \tau_0}{\tau_{\max}} \ll 1$$

Ainsi, on peut simplifier l'équation (1)

$$V_+[\tau(\theta)] - V_-[\tau(\theta)] \approx -|V'(\tau_{\max})|(\tau - \tau_{\max}) \quad (3)$$

dans le cas présent où la tension membranaire initiale est très proche de la tension membranaire à la fin de l'étalement ($\tau_0 \approx \tau_{\max}$), on peut exprimer τ en fonction du temps

$$\int_0^{\frac{\tau - \tau_0}{\tau_{\max} - \tau_0}} du \frac{u^{2/\beta - 1}}{1 - u} = 2\alpha t \quad (4)$$

où α est un temps caractéristique de l'étalement, dépendant de la tension membranaire, de la vitesse de polymérisation et des constantes de raideur du réseau d'actine. L'aire normalisée de la zone de contact est proportionnelle au carré de l'angle de contact microscopique, ainsi

$$\frac{A(t)}{A_\infty} \propto \theta^2 \quad (5)$$

En utilisant l'équation (2) et (4) dans l'équation (3), puis en insérant ensuite dans l'équation (1) et (4), on obtient l'expression de l'aire normalisée de la zone de contact en fonction du temps

$$A(t) = A_\infty \tanh(\alpha t)$$

Les courbes expérimentales ont été ajustées avec cette équation. Ce modèle nous renseigne sur la mécanique de l'étalement cellulaire. On ne peut pas l'appliquer à des courbes moyennes, puisque $\sum \tanh(\alpha t) \neq \tanh(\sum \alpha t)$. Les cas réguliers représentent en moyenne 30 % des cellules étudiés. Nous verrons dans le paragraphe 5.3 que l'augmentation de la concentration de calcium libre augmente la proportion de cas réguliers. Ainsi ce modèle nous permet d'ajuster les courbes expérimentales et renseigne sur la pente à l'origine (αA_∞) et sur la surface atteinte par la cellule à la fin de la phase d'étalement (A_∞).

Pour toutes les autres cellules dont l'étalement est irrégulier, on va déterminer la taille moyenne des pics de protrusions pendant l'étalement, ainsi que la période de ces pics. Ces

deux paramètres corrélient avec la pente à l'origine de la courbe d'étalement $\left. \frac{dA}{dt} \right|_{t=0}$, puisqu'au début, l'étalement est presque pur, il n'y a quasiment pas de rétractions.

5.3 Rôle du calcium dans l'étalement des cellules sauvages

Plus la concentration de calcium libre dans le tampon est importante, plus la vitesse cellulaire est grande (§ 3.1.3). Nous avons donc émis l'hypothèse que la variation de la concentration de calcium libre a une influence sur l'étalement cellulaire. Nous allons présenter dans cette partie les résultats concernant l'effet d'une forte augmentation de la concentration de calcium sur la cinétique et la régularité de l'étalement cellulaire.

Les courbes d'étalement moyen nous montrent que l'ajout de 1 mM de calcium dans le tampon SB modifie la cinétique de l'étalement et également la surface totale atteinte par les cellules à la fin de l'étalement (figure 5.13).

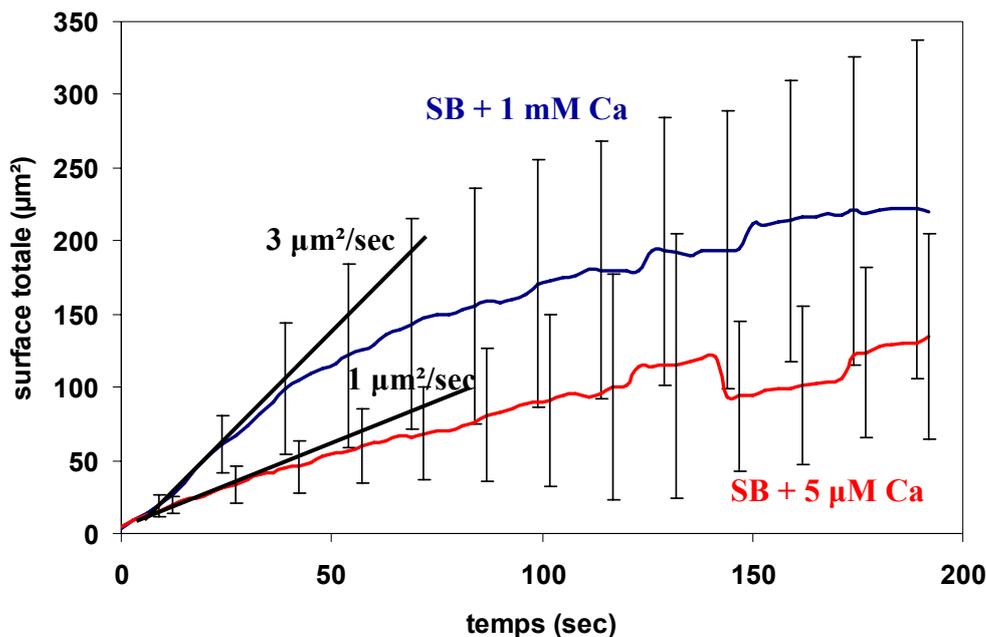


Fig 5.13 : Cinétiques moyennes d'étalement de cellules AX2 sur du verre, en présence de 5 µM ou de 1 mM de calcium. La moyenne est faite sur 10 cellules pour chacune des courbes. Le décrochement observé vers $t = 140$ secondes pour la courbe en SB + 5 µM Ca correspond à la diminution du nombre moyen de cellules considérées.

Pour les résultats de la figure 5.13, les expériences ont été effectuées le même jour afin de s'affranchir des variations expérimentales liées à la culture cellulaire. La cinétique initiale d'étalement moyen est trois fois plus grande en présence de 1 mM de calcium. L'aire

moyenne des zones de contact atteinte à la fin de l'expérience est presque deux fois plus grande.

Le calcium a également un effet sur la régularité de l'étalement. Les cellules qui s'étaient régulièrement en tampon SB ne représentent au total que 30 % des cas observés. La plupart des cellules s'étaient en plusieurs fois. L'ajout de 1 mM de calcium dans le tampon augmente de façon très significative le pourcentage de cas réguliers, jusqu'à 75 % des cas observés (figure 5.14, partie A. Voir aussi le tableau 5.1).

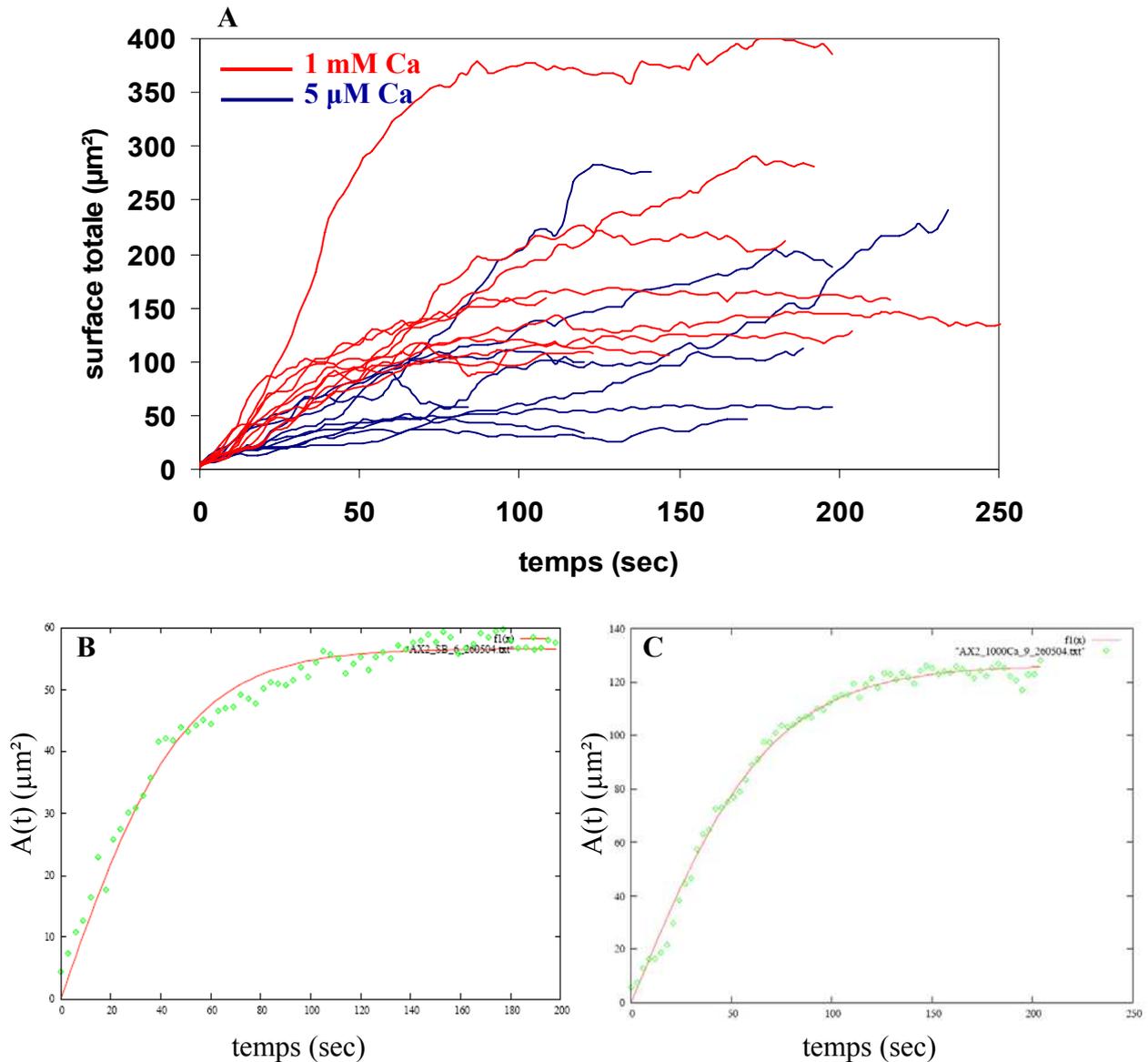


Fig 5.14 : **A.** Cinétiques d'étalement de cellules AX2 individuelles, avec et sans calcium ajouté. Ces courbes ont servi à faire les cinétiques d'étalement moyen de la figure 5.13. **B et C.** Ajustement par le modèle (courbes rouges) de courbes d'étalement expérimentales provenant du graphe A. **B** : courbe en SB + 5 μM calcium. **C** : courbes en SB + 1 mM calcium. Les graphes représentent la surface totale en μm^2 en fonction du temps en secondes.

La figure 5.14 (B et C) montre des exemples de courbes d'étalement expérimentales ajustées par le modèle physique de l'étalement cellulaire. Les cellules ajustables s'étalent en une fois et présentent une asymptote horizontale (cellules régulières).

$[Ca^{2+}]$ (μM)	5	30	100	300	1000
Cas réguliers	30 %	50 %	55 %	55 %	75 %

Tableau 5.1 : pourcentage de cas d'étalement réguliers en fonction de la concentration de calcium libre, pour toutes les cellules étudiées.

Sur la figure 5.15, nous avons représenté la surface totale A_∞ en fonction de la pente à l'origine αA_∞ , pour les cellules de la figure 5.14 dont l'étalement est ajustable par le modèle de Chamaraux et al. Nous voyons que le calcium augmente la cinétique de l'étalement et la surface totale finale (tableau 5.2).

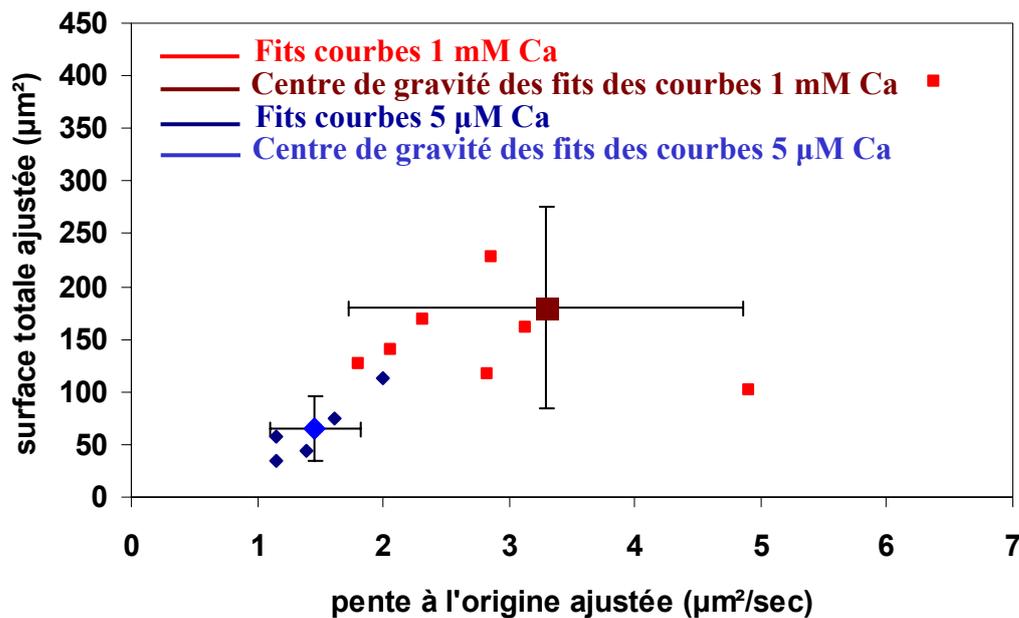


Fig 5.15 : Représentation de la surface totale finale en fonction de la pente à l'origine, deux paramètres obtenus en ajustant les courbes d'étalement expérimentales avec le modèle.

	SB + 5 μM Ca	SB + 30 μM Ca	SB + 1 mM Ca
A_∞ (μm^2)	64 \pm 30	127 \pm 40	180 \pm 95
αA_∞ ($\mu m^2/sec$)	1,46 \pm 0,35	1,93 \pm 0,8	3,3 \pm 1,5

Tableau 5.2 : Cinétique d'étalement et surface totale finale en fonction de $[Ca]$.

L'étude des courbes d'expansion et de rétraction individuelles permet aussi de retrouver ce résultat (figures 5.16 et 5.17). Dans ce qui suit, nous nous sommes intéressés à la phase de croissance de la surface de contact, avant l'apparition des rétractions. L'apparition des rétractions (c'est-à-dire la transition entre la phase de croissance et la phase de mouvement) a lieu à des temps comparables à 5 μM calcium et à 1 mM calcium. De plus, l'étalement reste compris dans un angle de 30° environ de part et d'autre de la direction générale prise par la cellule à un instant donné, et cet angle ne varie pas avec la concentration de calcium. Ces deux paramètres sont donc indépendants de la concentration de calcium (figure 5.18). La mesure des périodes des pics nous donnent $22,5 \pm 7$ secondes dans le cas de l'étalement en présence de 5 μM de calcium et 23 ± 5 secondes dans le cas de l'étalement en présence de 1 mM de calcium. La période des protrusions reste donc constante en fonction de la concentration de calcium.

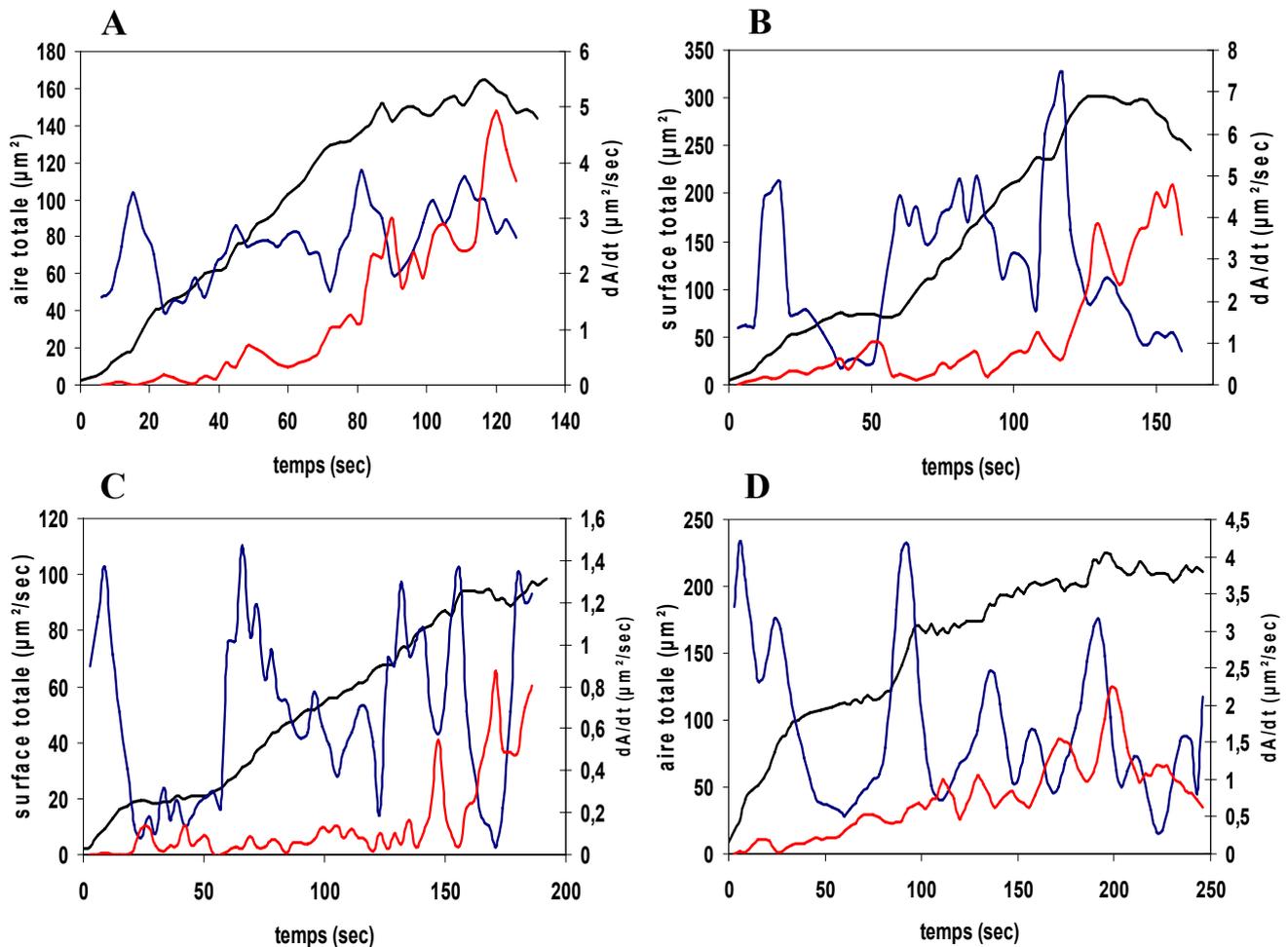


Fig 5.16 : Courbes de surface totale (noire), des taux d'expansion (bleue) et de rétraction (rouge) des cellules AX2 en étalement en tampon SB sans calcium ajouté. L'étalement est irrégulier pour les cas B, C, D. Les courbes de surface totale ont été choisies parmi celles de la figure 5.14.

Par contre, la hauteur moyenne des pics vaut $2,5 \pm 1,2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ en tampon SB contre $5,2 \pm 2,6 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ à 1 mM de calcium libre. On retrouve presque le résultat obtenu lors des mesures de vitesses sous flux : l'augmentation de la concentration de calcium augmente la taille des protrusions d'un facteur 2 sans en changer la fréquence. Ce résultat explique que lors de l'étalement cellulaire, la cinétique soit plus rapide et la surface finale de la zone de contact plus grande en présence de 1 mM de calcium libre.

La majorité des cellules présente bien un étalement irrégulier en tampon SB, et cela se traduit au niveau du taux d'expansion par la présence de nombreux groupes de pics. Plus l'étalement est régulier, plus les pics sont larges. C'est visible sur les graphes B, C et D des figures 5.16 et 5.17 : sur la figure 5.16, l'étalement est irrégulier, et on observe au moins trois groupes de pics avant la phase de motilité. Par contre, sur la figure 5.17 (en présence de 1 mM de calcium), il n'y a en général qu'un groupe de pics (B,C et D), ce qui conduit à des étalements réguliers. La présence de calcium permet donc à la cellule d'associer des pseudopodes dès le contact initial et donc d'atteindre sa surface maximale en une seule fois.

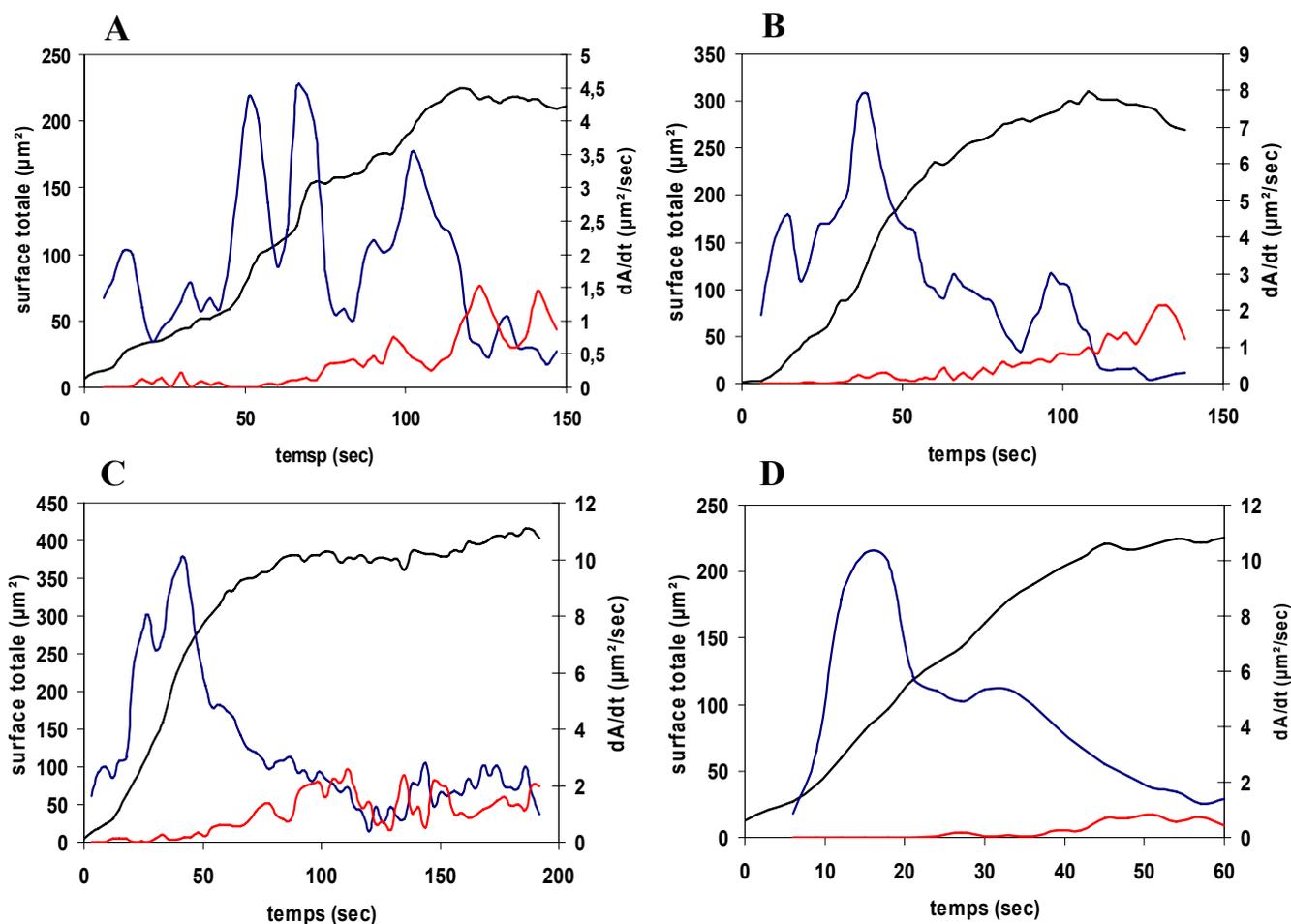


Fig 5.17 : Courbes de surface totale (noire), des taux d'expansion (bleue) et de rétraction (rouge) des cellules AX2 en étalement en tampon SB avec 1 mM de calcium ajouté. l'étalement est régulier pour les cas B, C, D. Les courbes de surface totale ont été choisies parmi celles de la figure 5.14.

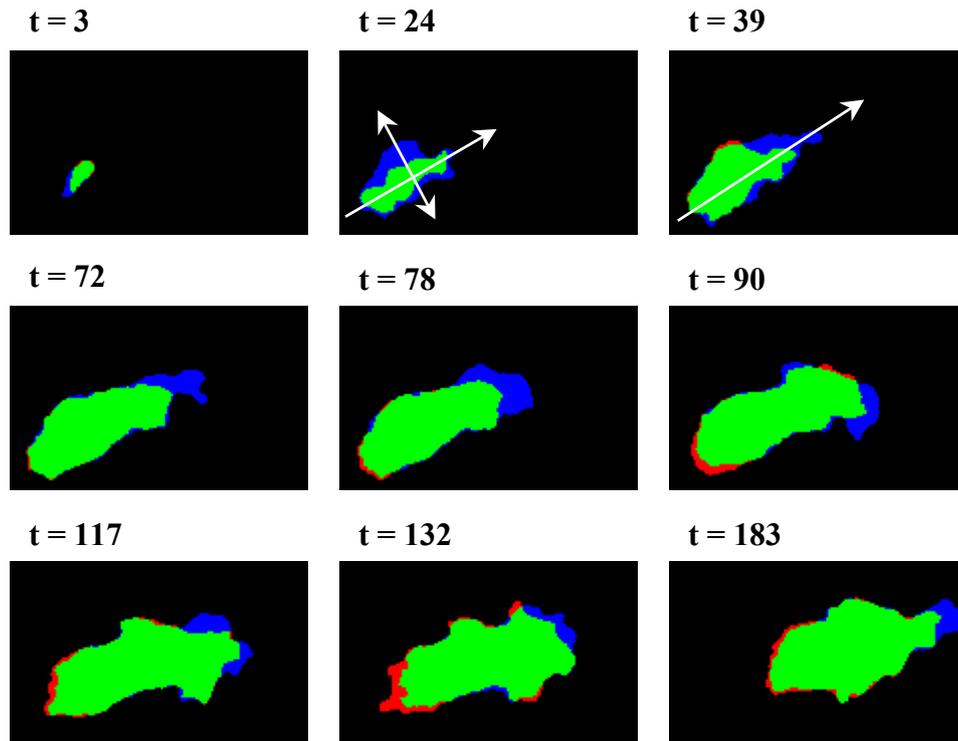


Fig 5.18 : Cellule AX2 en étalement, en présence de 1 mM de calcium. La durée de la phase de croissance est comparable à celle observée lors de l'étalement de cellules AX2 en SB : la cellule ne fait que s'étaler pour $3 < t < 75$, et est motile pour $75 < t < 183$. La figure 5.18 et 5.17.C correspondent à la même cellule.

On peut d'ailleurs mesurer directement la pente initiale et l'aire maximale sur les courbes d'étalement des cellules exclues de l'ajustement et reporter les valeurs obtenues sur la figure 5.15. les nouveaux points, qui proviennent presque tous des cinétiques mesurées en présence de 5 μM de calcium, modifient la position du barycentre : la pente initiale est quasiment inchangée ($1,35 \pm 0,43 \mu\text{m}^2/\text{sec}$), mais une aire totale ($132 \pm 125 \mu\text{m}^2$) quasiment comparable à celles mesurées en présence de 1 mM de calcium. Nous en déduisons que les courbes ajustables obtenues à 5 μM de calcium représentées figure 5.15 correspondant à des cinétiques incomplètes, ce qui explique l'aire maximale inférieure en moyenne.

En conclusion, le calcium extracellulaire accélère l'étalement cellulaire par deux effets :

- Il augmente d'un facteur 2 la taille des protrusions permettant l'étalement, sans en modifier la fréquence. On retrouve ici une conclusion similaire à celle tirée de l'analyse de la motilité sous flux.

- Il synchronise l'ensemble des protrusions sur l'instant du contact initial. Cet effet est nouveau. De la sorte, la présence de calcium diminue grandement les accélérations et décélérations locales de l'aire pendant la phase de croissance.

Il faut noter que ces deux effets peuvent être liés : une protrusion de taille double peut être vue – mathématiquement – comme deux protrusions de taille unitaire simultanées. Cela s'explique par des protrusions plus grosses alors que leur fréquence d'apparition reste la même : les protrusions se chevauchent.

5.4 Effet de la cytochalasine A sur l'étalement des cellules sauvages

La phase de croissance de la surface de contact est de l'étalement pur, dû à l'émission de protrusions. Cela suggère que seule la polymérisation d'actine est mise en jeu. Pour le vérifier, nous avons utilisé ici une drogue, la cytochalasine A, qui empêche l'actine de polymériser en se fixant aux extrémités barbées des filaments d'actine : elle empêche l'élongation du filament.

On ajoute la cytochalasine A deux minutes avant de commencer l'expérience. A 5 μM de calcium libre, en présence de 3 $\mu\text{g/mL}$ de cytochalasine A, les cellules s'étaient très lentement sur la surface, elles sont juste capables de faire un point de contact dans les deux premières minutes de l'étalement, temps au bout duquel les cellules contrôles ont atteint leur surface d'étalement maximale. En présence de 1 mM de calcium libre, l'effet de la cytochalasine A à la même concentration est moins net, quoique significatif. On observe une sévère réduction dans la cinétique de l'étalement et de la surface de la zone de contact atteinte au bout de deux minutes (figure 5.19) ; Il faut ajouter 6 $\mu\text{g/mL}$ de cytochalasine A pour inhiber totalement la cinétique d'étalement en présence d'1 mM de calcium. Il y a donc une compétition entre l'effet du calcium et l'effet de la cytochalasine A sur la polymérisation d'actine.

Ces expériences nous montrent deux choses :

- La polymérisation de l'actine est essentielle à la cellule pour assurer l'étalement sur un substrat, l'étalement est donc un processus dynamique dépendant de l'actine.
- Il y a une compétition entre l'effet du calcium et l'effet de la cytochalasine A sur la polymérisation d'actine. Le calcium extracellulaire amplifie la polymérisation de l'actine, augmentant le nombre d'extrémités barbées. Une plus grande quantité de cytochalasine est donc nécessaire pour se fixer aux extrémités des filaments d'actine et

empêcher la polymérisation. Ceci est dû, soit à la nucléation d'actine, soit au clivage des filaments d'actine.

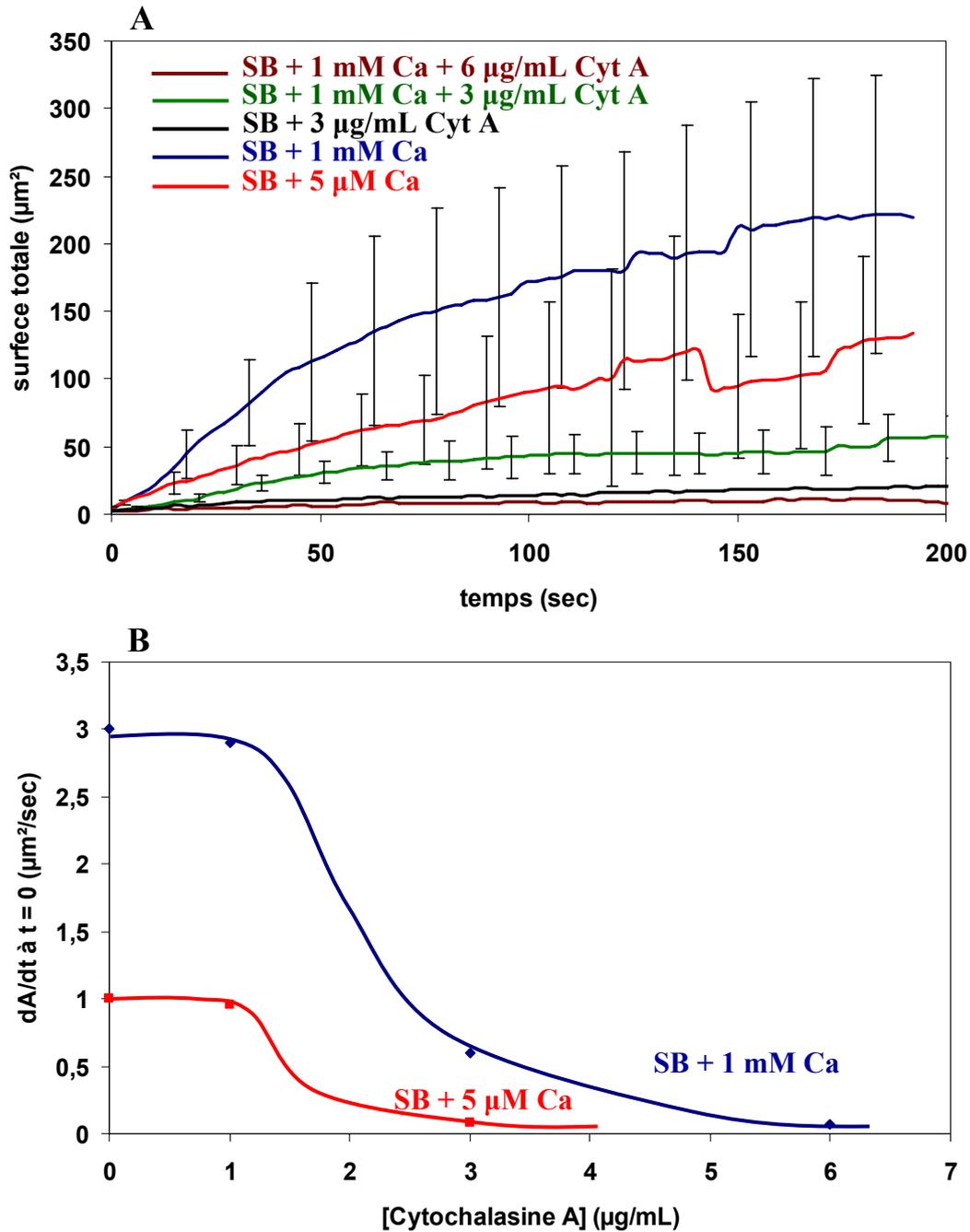


Fig 5.19 : A. Courbes d'étalement moyen de cellules AX2 en présence de différentes concentrations de calcium extracellulaire et de cytochalasine A. - B. pente à l'origine des courbes d'étalement moyen ci-dessus. Les courbes sont un support visuel.

5.5 Étalement des cellules mutantes $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$, rôle des protéines G hétérotrimériques dans l'étalement

L'étude de la motilité sous contrainte hydrodynamique de cellules mutantes $G\beta\Delta$ a montré que l'absence de protéines G hétérotrimériques fonctionnelles rend la vitesse des cellules $G\beta\Delta$ insensibles aux variations de la concentration de calcium dans le tampon, mais elles restent cependant sensibles aux forces hydrodynamiques. Ceci s'explique par le fait que la taille et la fréquence des protrusions et des rétractions ne varient pas avec la concentration de calcium. En revanche, les cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$ ont une sensibilité au calcium rétablie, car la taille des protrusions et des rétractions augmente avec la concentration de calcium (cf. § 3.2.1 et § 4.4). Nous avons donc étudié l'effet d'une augmentation de la concentration de calcium sur l'étalement de ces souches cellulaires.

La représentation des taux d'expansion et de rétraction, ainsi que de l'évolution de la surface de contact totale en fonction du temps montre que l'étalement des cellules $G\beta\Delta$ est très irrégulier (figure 5.20). La cellule s'étale en plusieurs morceaux, et la surface finale de la zone de contact n'est pas constante, même pendant la phase de mouvement. La phase de croissance a lieu à $0 < t < 60$ et la phase de mouvement à $60 < t < 100$: la surface de contact diminue durant la phase de motilité. Nous avons fréquemment observé ce phénomène pour les cellules $G\beta\Delta$.

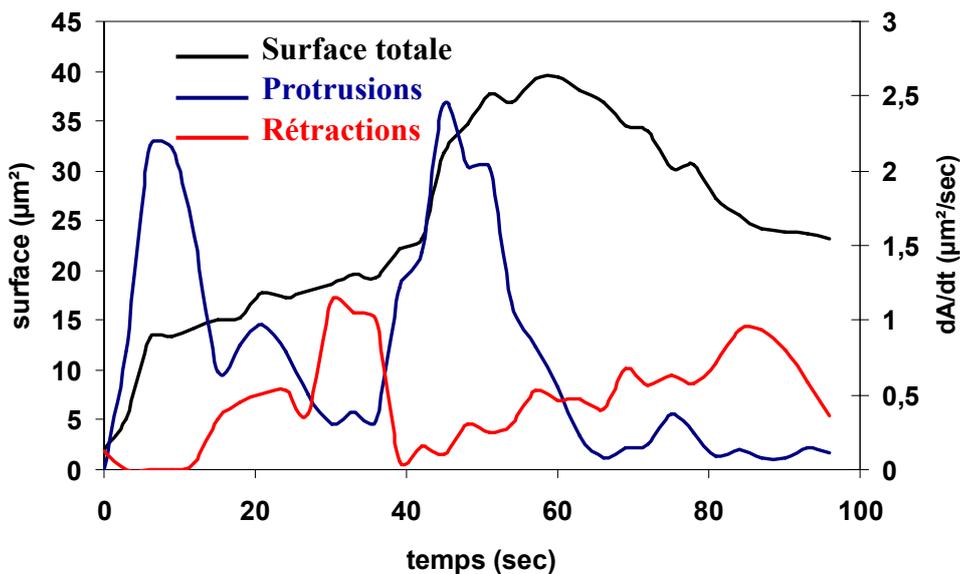


Fig 5.20 : Cellule $G\beta\Delta$ en étalement sur une surface de verre en tampon SB. L'étalement est très irrégulier (courbe noire : surface totale), et les taux d'expansion (bleu) et de rétraction (rouge) sont faibles.

Les taux d'expansion et de rétraction sont faibles comparés aux cellules sauvages, de même que la surface maximale atteinte par la cellule. En moyenne, la taille des protrusions vaut $1 \pm 0,7 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. Parmi nos expériences, aucun étalement de cellules individuelles n'a pu être ajusté avec le modèle physique de l'étalement cellulaire de Chamaraux-Fourcade.

Nous avons effectué les mêmes expériences d'étalement avec les cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$. Dans ces conditions, le comportement des cellules sauvages est restauré (figure 5.21). L'étalement est bien plus régulier, et on peut ajuster avec le modèle le même pourcentage de cellules que pour la souche sauvage AX2. La surface totale atteinte par les cellules $G\beta\Delta+G\beta$ est aussi plus grande que celle atteinte par les cellules $G\beta\Delta$.

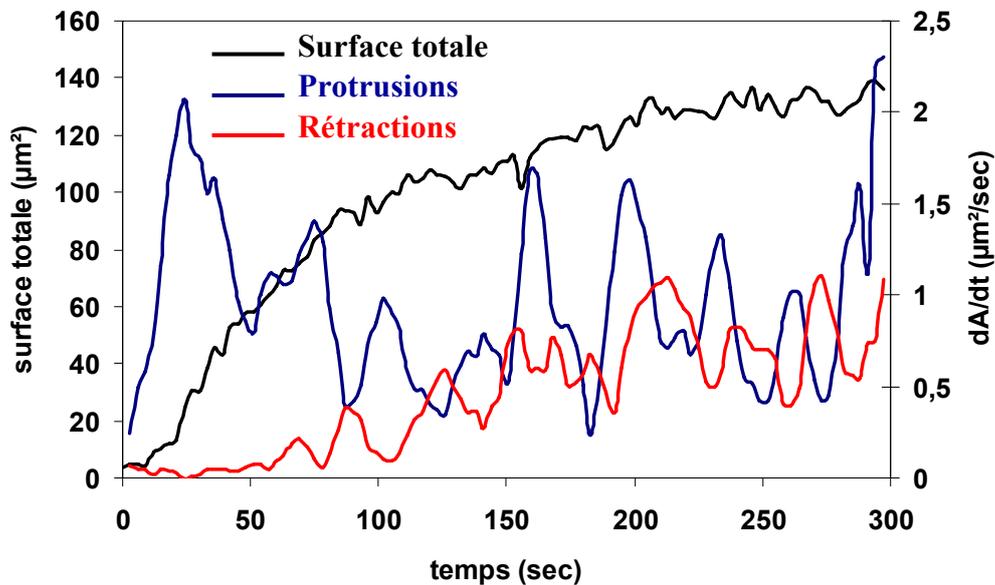


Fig 5.21 : Cellule $G\beta\Delta+G\beta$ en étalement sur une surface de verre en tampon SB. L'étalement est régulier (courbe noire : surface totale), et les taux d'expansion (bleu) et de rétraction (rouge) sont plus importants que ceux du mutant nul $G\beta\Delta$.

La taille moyenne des pics du taux d'expansion vaut $1,5 \pm 0,6 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. La période des pics est de l'ordre de 30 ± 11 secondes, ce qui est proche des valeurs trouvées pour les cellules sauvages AX2. Le grand écart-type est dû à un nombre d'expériences moins important avec les cellules $G\beta\Delta+G\beta$ qu'avec les cellules AX2. Par contre nous ne pouvons pas de donner de mesures précises sur la période des pics de protrusions des cellules $G\beta\Delta$, l'étalement de ces mutants étant trop irréguliers. On peut cependant affirmer que cette période n'est pas plus

faible que les autres par le décompte du nombre de pics en fonction de la durée de l'expérience.

Nous avons également représenté l'évolution de la surface totale moyenne de la zone de contact en fonction du temps pour les cellules $G\beta\Delta$ et $G\beta\Delta+G\beta$ (figure 5.22). Durant les 20 premières secondes de l'étalement, la cinétique des deux souches cellulaires est la même. Mais après, la surface totale des $G\beta\Delta$ n'évolue presque plus, et reste à une valeur de $20 \mu\text{m}^2$. par contre, l'étalement chez les cellules $G\beta\Delta+G\beta$ se poursuit jusqu'à $t = 100$ secondes et se stabilise ensuite. Les cellules $G\beta\Delta$ présentent donc un défaut d'étalement, étalement qui de plus est très irrégulier.

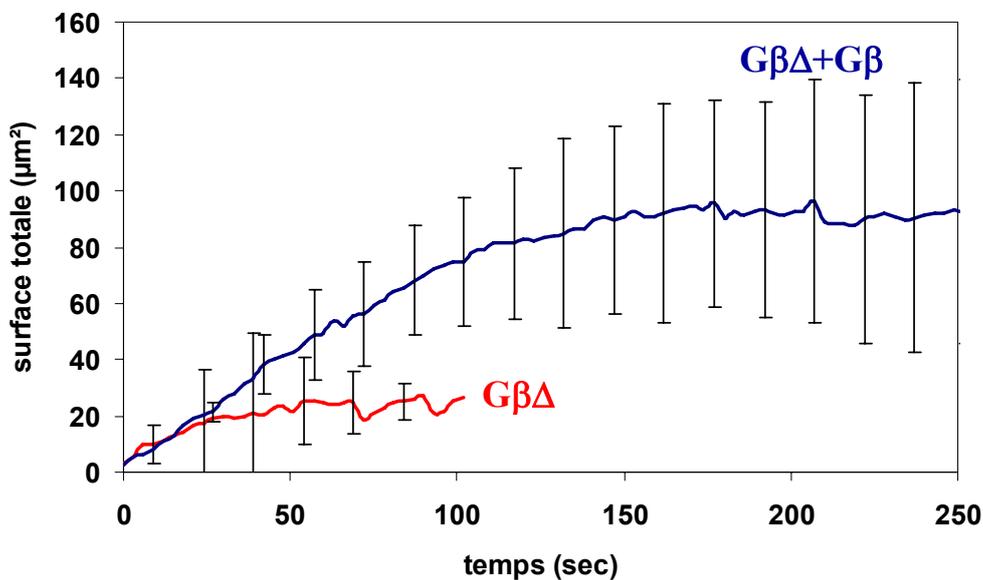


Fig 5.22 : Evolution de la surface de contact moyenne des cellules $G\beta\Delta$ et des cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$. Etalement des cellules sur du verre en tampon SB.

Nous avons ensuite testé l'étalement moyen de ces cellules en ajoutant dans le tampon SB 1 mM de calcium (figure 5.23). Sur les 25 premières secondes, la cinétique d'étalement des cellules $G\beta\Delta$ reste la même, quelle que soit la concentration de calcium. La surface totale moyenne de la zone de contact finale reste inférieure à celle des cellules complémentées étudiées en tampon SB. L'effet du calcium est en revanche important sur la cinétique d'étalement des cellules $G\beta\Delta+G\beta$, où elle passe de $0,8 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ à $2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. La surface de la zone de contact finale est également plus grande, $120 \mu\text{m}^2$ contre $85 \mu\text{m}^2$.

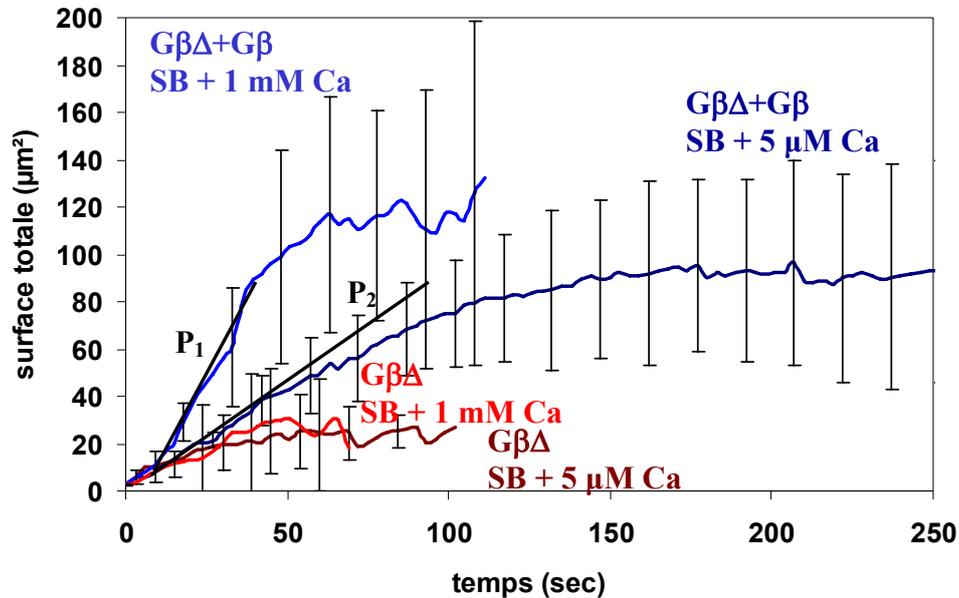


Fig 5.23 : Evolution de la surface de contact moyenne des cellules $G\beta\Delta$ et des cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$. Étalement des cellules sur du verre en tampon SB et en SB + 1 mM de calcium. $P_1 = 2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ et $P_2 = 0,8 \mu\text{m}^2/\text{sec}$.

De plus, l'ajout de 1 mM de calcium dans le tampon n'arrange en rien la régularité de l'étalement des cellules $G\beta\Delta$. De même, la taille des protrusions est stable, environ $1,5 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. Le grand écart type traduit l'irrégularité de l'étalement et les nombreuses fluctuations de la surface de la zone de contact. Pour cette raison, il nous est difficile d'estimer la période des protrusions. Par contre l'étalement des cellules $G\beta\Delta+G\beta$ est plus régulier : on peut ajuster le même taux de courbes avec le modèle physique que les courbes d'étalement des cellules AX2 en présence de 1 mM de calcium. La taille moyenne des protrusions est plus grande, $2,2 \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{sec}$. En comparaison avec les cellules $G\beta\Delta$, l'écart type montre bien que la dispersion de tailles des protrusions est faible et l'étalement moins fluctuant. La période des protrusions vaut ici 25 ± 8 secondes, ce qui est non seulement comparable avec la période des protrusions des cellules $G\beta\Delta+G\beta$ en étalement en tampon SB, mais aussi à toutes les périodes mesurées pour des cellules en étalement (voir la figure 5.24 pour les résultats exposés sur cette page).

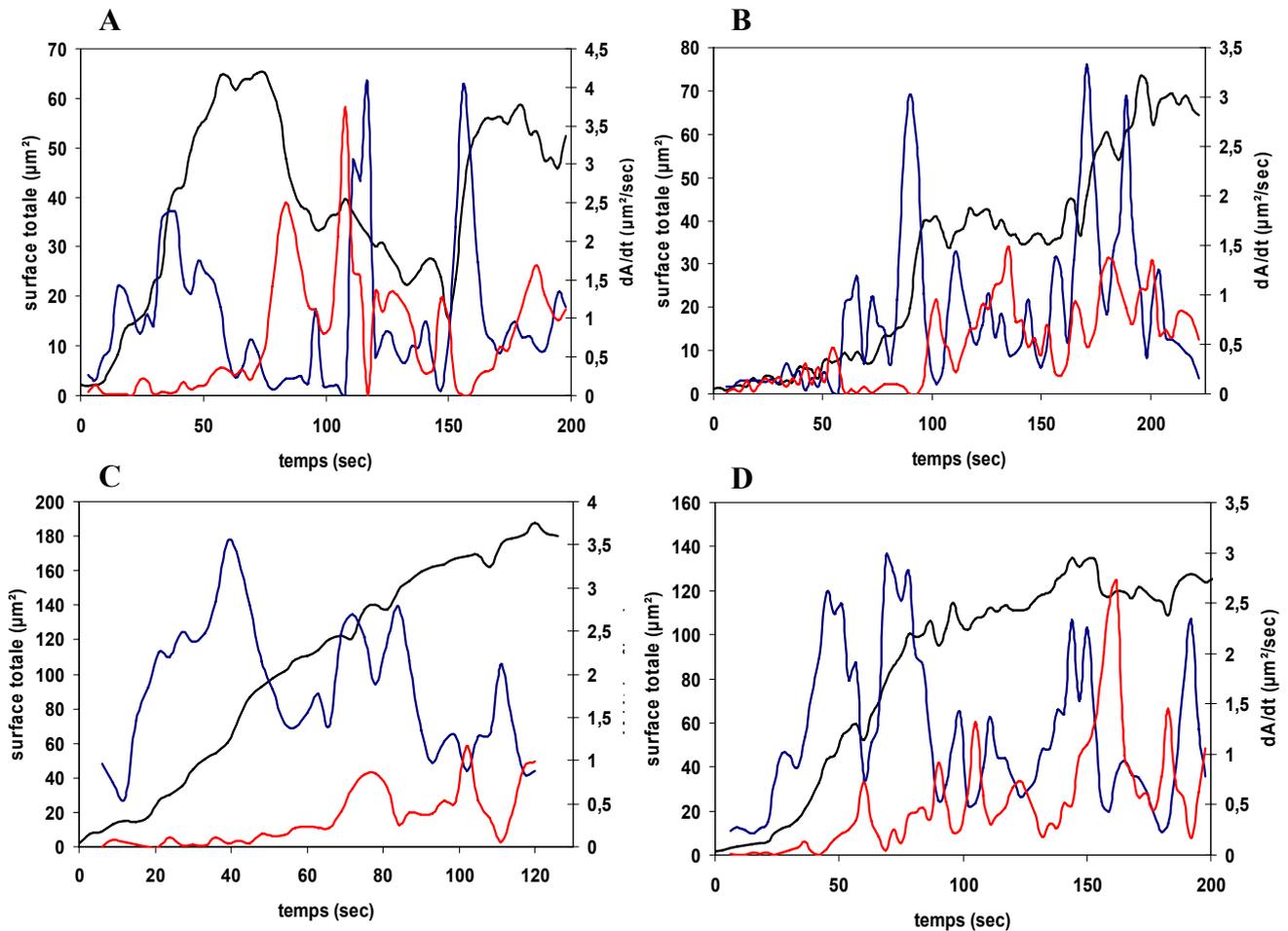


Fig 5.24 : Courbes de surface totale (noire), des taux d'expansion (bleue) et de rétraction (rouge) des cellules $G\beta\Delta$ (A et B) et $G\beta\Delta+G\beta$ (C et D) en étalement en tampon SB avec 1 mM de calcium ajouté. L'étalement est régulier pour les cas C et D.

L'augmentation de la concentration de calcium a donc peu d'effet sur l'efficacité de l'étalement des cellules $G\beta\Delta$, contrairement au cellules complémentées $G\beta\Delta+G\beta$. Ces dernières sont plus actives, émettent plus de protrusions que les cellules sans protéines G hétérotrimériques fonctionnelles. Les protéines G sont donc nécessaires à l'émission de protrusions chez *D. discoideum* au niveau de la zone de contact.

5.6 Rôle de la myosine 2 dans l'étalement : étude des cellules *myo2null*

La myosine 2 est une protéine du cytosquelette chez *D. discoideum*. Les filaments de myosine se lient aux filaments d'actine grâce à leur tête, qui possède un domaine de liaison à l'actine et un domaine de liaison à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP permet à la tête d'un filament de myosine de changer de conformation et ainsi de permettre une contraction ou un relâchement du complexe formé par l'actine et la myosine.

Lors du mouvement cellulaire, tandis que les protrusions sont uniquement dues au cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine, les rétractions sont dues à la contraction du complexe actine/myosine. Nous allons retrouver ce résultat en étudiant l'étalement de cellules mutantes dépourvues du gène qui code pour la myosine 2 : les cellules *myo2null*. Nous avons également étudié l'effet d'une augmentation de la concentration de calcium libre sur l'étalement de ces cellules mutantes.

La représentation des taux d'expansion et de rétraction, ainsi que de l'évolution de la surface de contact totale en fonction du temps montrent que l'étalement des cellules *Myo2null* ressemble à celui des cellules parentales AX2. Une fraction de ces cellules présentent une courbe d'étalement régulière qui peut être ajustée par le modèle physique : 25 % pour l'étalement des cellules *myo2null* en tampon SB.

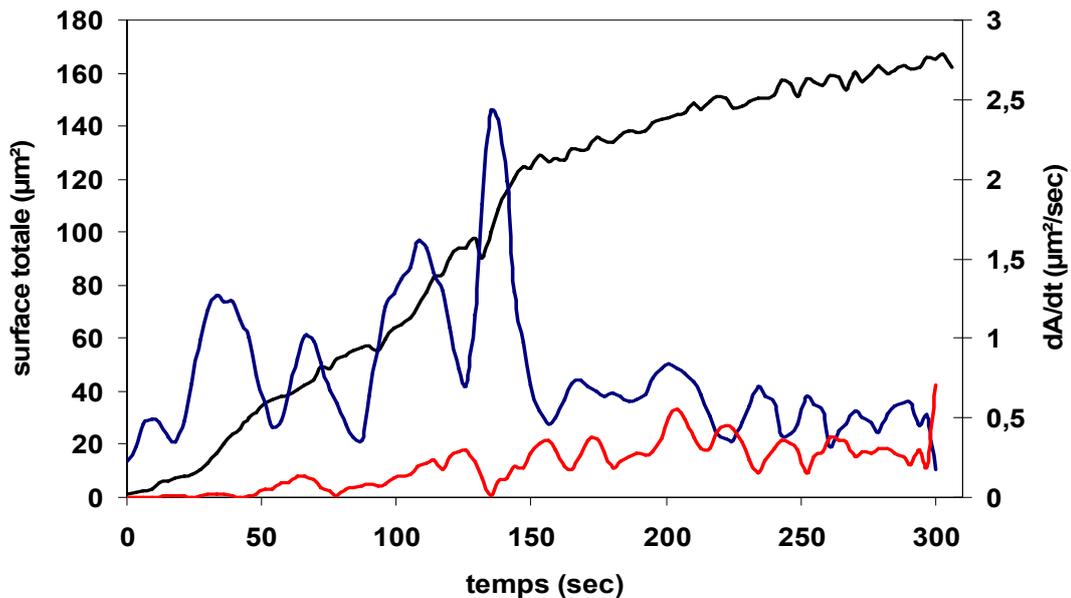


Fig 5.25 : Cellule *Myo2null* en étalement sur une surface de verre en tampon SB. L'étalement est aussi régulier que chez les cellules AX2 (courbe noires). Le taux d'expansion est représenté en bleu. Le taux de rétraction, en rouge est très faible.

Sur la figure 5.25, la surface de la zone de contact de la cellule augmente jusqu'à $t = 150$ secondes. Cette phase est caractérisée, comme pour les cellules sauvages AX2, par la présence de plusieurs pics dans le taux d'expansion, qui correspondent à des protrusions. Ce qui est frappant, sur les enregistrements réalisés avec les cellules *myo2null*, c'est qu'après 150 secondes, la surface de contact évolue peu, et la cellule reste immobile : il y a très peu de protrusions et quasiment pas de rétractions, le taux de rétraction étant très faible ($< 0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ contre $2,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour les AX2). La période des pics de protrusions est de 30 ± 9 secondes, ce qui est proche de la période calculée pour les autres types cellulaires. La taille moyenne des pics est de $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$, contre $2,7 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour la taille des pics des cellules AX2 dans les mêmes conditions (voir § 5.2). En revanche, les pics sont plus larges chez les cellules *Myo2null*. Ceci s'explique par le fait que l'étalement de ces cellules mutantes soient moins directionnel que les cellules sauvages (figure 5.26). L'étalement, à partir de la direction initiale prise par la cellule en étalement, peut être compris dans un cône d'angle supérieur à 90° par la suite.

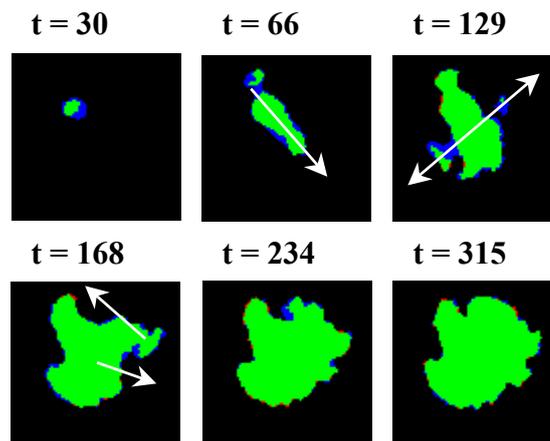


Fig 5.26 : Cellule *Myo2null* en étalement, sur du verre en tampon SB. Bien que directionnel au début (la première minute, direction indiquée par la flèche), l'étalement devient rapidement isotrope. Il y a très peu de rétractions durant toute l'expérience. Le temps est exprimé en secondes. Les figure 5.25 et 5.26 correspondent à la même cellule.

Sur la figure 5.27, nous avons représenté les courbes d'étalement moyen des cellules *Myo2null* et AX2 en tampon SB. Les courbes se superposent, les cinétiques d'étalement sont les mêmes, ce qui prouve que l'étalement, pendant la phase de croissance, est uniquement dû à l'émission des protrusions, et donc au cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine.

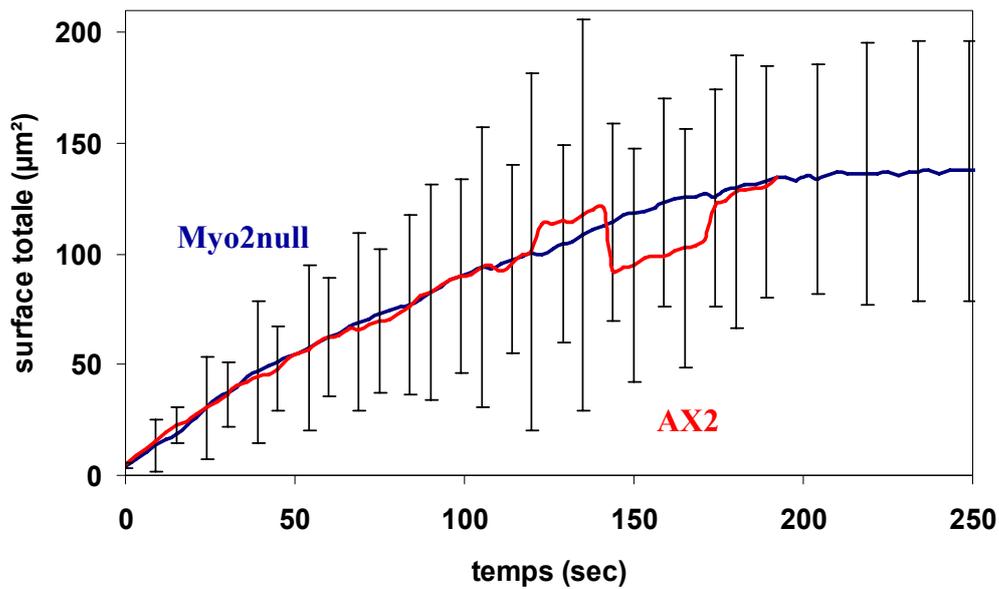


Fig 5.27 : Étalement moyen des cellules *Myo2null* et *AX2* en tampon SB. Les courbes se superposent quasiment.

Nous avons également testé l'étalement moyen de ces cellules en ajoutant dans le tampon SB 1 mM de calcium (figure 5.28).

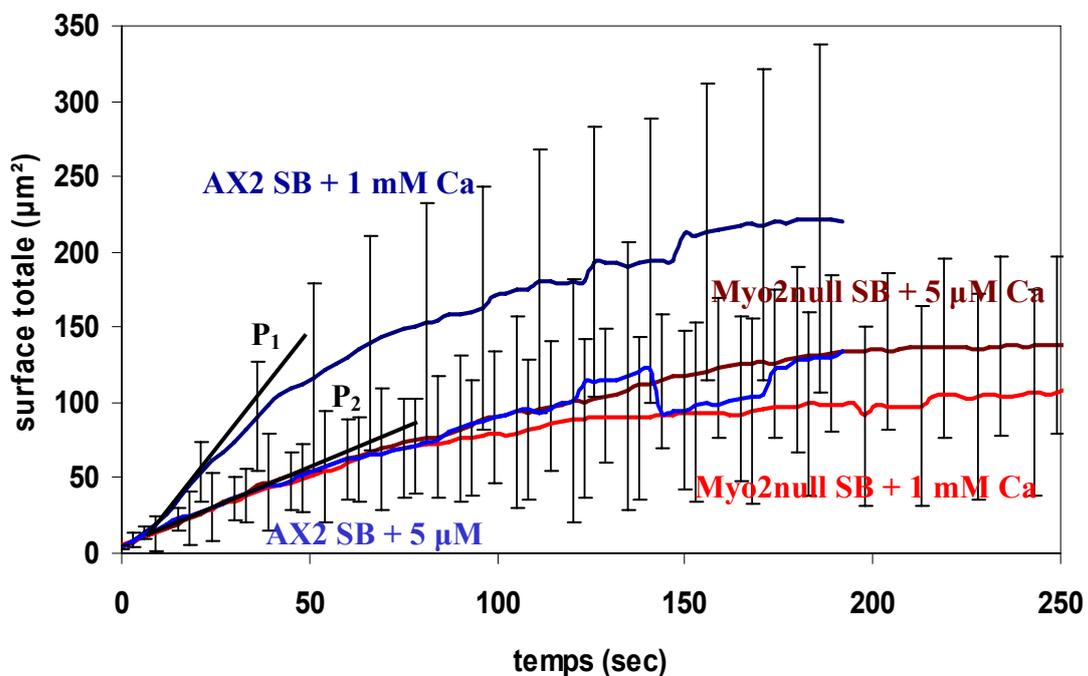


Fig 5.28 : Étalement moyen des cellules *AX2* et *Myo2null* en tampon SB et en présence de 1 mM de calcium libre. l'ajout de calcium n'a pas d'effet sur la cinétique de l'étalement des cellules *Myo2null*. $P_1 = 3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ et $P_2 = 1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$.

Compte tenu de l'écart type, on voit que l'augmentation de la concentration de calcium n'a d'effet ni sur la cinétique de l'étalement ni sur la taille de la surface moyenne de la zone de contact des cellules Myo2null à la fin de l'expérience. Ces deux grandeurs sont les mêmes que celles observées sur l'étalement des cellules AX2 en tampon SB.

Sur des cellules individuelles, la comparaison des taux d'expansion des cellules mutantes en étalement, avec et sans calcium ajouté (figure 5.29), montre qu'il n'y a pas de différence au niveau de la taille des protrusions ou de leur période. On mesure $1,65 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ et 30 ± 11 secondes avec 1 mM de calcium contre $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ et 30 ± 9 secondes à 5 μM de calcium. Le taux de rétraction reste très faible, les cellules sont toujours immobiles à la fin de l'expérience.

Enfin, l'ajout de calcium n'augmente pas la régularité de l'étalement, puisque seulement 25 % des cellules en étalement en présence de 1 mM de calcium sont ajustables par le modèle physique.

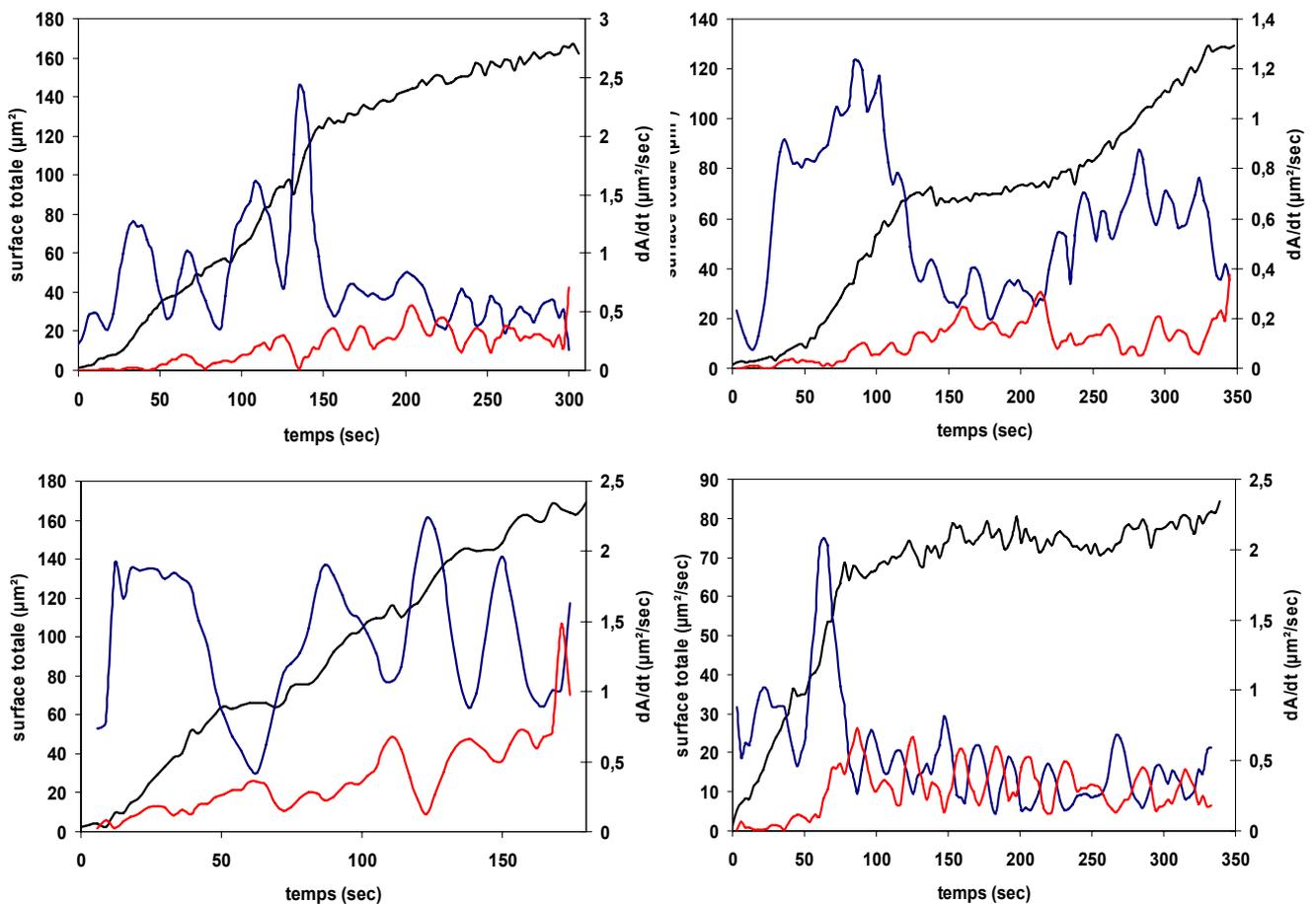


Fig 5.29 : Courbes de surface totale (noire), des taux d'expansion (bleue) et de rétraction (rouge) des cellules Myo2null en étalement en tampon SB (A et B) et avec 1 mM de calcium ajouté (C et D).

En conclusion, l'invalidation du gène codant pour la myosine 2 n'empêche pas l'étalement ni l'apparition d'oscillations au moment de l'étalement. Par contre, le mouvement cellulaire ne peut avoir lieu si la cellule n'est pas en mesure de se rétracter. La cellule myo2null étalée émet des protrusions de taille bien plus petite que la cellule parentale (0,5 contre 2,5 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$) et l'amplitude de ces protrusions n'est pas augmentée par le calcium extracellulaire. Ces expériences montrent que les événements protrusion et rétraction sont complémentaires et indissociables dans la motilité cellulaire, mais que notre mesure quantitative de l'étalement les dissocie. La période des oscillations des protrusions est invariante, quel que soit le type cellulaire testé jusqu'ici et la concentration de calcium.

6 DISCUSSION

		AX2	G β Δ	R-IP $_3$ Δ	Myo2null
Motilité $\sigma = 2,4$ Pa	Vitesse ($\mu\text{m}/\text{min}$)	9 à 30 suivant [Ca], K = 30 μM	5 Indépendant de [Ca]	5 à 20 suivant [Ca] K = 600 μM	
	Orientation	$\sigma < 0,6$ Pa : bi-directionnel $\sigma > 0,6$: sens du flux quelle que soit [Ca]	Comme AX2, mais moins sensibles	Comme AX2, mais moins sensibles	
	$dA/dt)_{\text{max}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{sec}$)	1,8 à 4,5 suivant [Ca] K = 30 μM (P = R)	1,5 et pas d'augmentation avec [Ca]	1,8 à 3 suivant [Ca] K = 800 μM	
	Période (sec)	10 (P) 12,5 (R)	Idem AX2	Idem AX2	
Étalement	A_{max} (μm^2)	100 à 250 suivant [Ca]	Cinétique trop faible pour visualiser la fin de l'étalement		100, indépendant de [Ca]
	$dA/dt)_{t=0}$ ($\mu\text{m}^2/\text{sec}$)	1 à 3 suivant [Ca]	0,8 et indépendant de [Ca]		1, indépendant de [Ca]
	$dA/dt)_{\text{max}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{sec}$)	2,5 à 5,2 suivant [Ca] (P)	1,5 et indépendant de [Ca], phase de croissance		1,5 indépendant de [Ca], phase de croissance.
	Période (sec)	25-30 (P et R)	Idem AX2		25-30 (P)

Tableau 6.1 : synthèse de l'ensemble des résultats obtenus sur l'étude de la motilité et de l'étalement des cellules sauvages et des mutants testés.

Ce travail montre le rôle important de la concentration de calcium externe dans l'adhérence et la motilité cellulaire de *D. discoideum*. Pour des concentrations inférieures à 10 μM , seule l'adhérence est affectée, nous en reparlerons dans le paragraphe 6.5. Pour des concentrations comprises entre 10 et 1000 μM , la vitesse moyenne des cellules augmente avec la concentration de calcium. La sensibilité aux forces de cisaillement est aussi augmentée puisque la contrainte nécessaire pour observer une motilité de 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ est abaissée de 5 Pa à 5 μM de calcium à 0,8 Pa à 1 mM de calcium. Deux protéines intracellulaires interviennent dans la sensibilité calcique : les protéines G hétérotrimériques et un analogue du récepteur à l' IP_3 . L'absence de protéines G fonctionnelles élimine l'ensemble de la réponse au calcium externe (hormis la sensibilité de l'adhérence aux bas niveaux de concentration) tandis que l'absence de récepteurs à l' IP_3 décale la courbe de réponse d'un facteur 20 en concentration de calcium. Enfin, l'augmentation de la vitesse corrèle avec une augmentation de la taille des protrusions et des rétractions. Un effet similaire est observé dans un dispositif expérimental reproduisant le phénomène d'étalement par contact. Nous en déduisons que l'effet du calcium extracellulaire favorise en premier lieu l'étalement des cellules *D. discoideum* sur le substrat.

Dans cette partie, nous allons tenter de répondre à plusieurs questions :

- Où est localisée et quelle(s) est (sont) la (les) cible(s) vraisemblable(s) du calcium extracellulaire ?
- Compte tenu des connaissances biochimiques sur la signalisation calcique chez *D. discoideum*, quel schéma mécanistique peut-on proposer pour expliquer l'ensemble des résultats obtenus ?
- Quel rôle le calcium joue-t-il dans la sensibilité aux forces extérieures (mécanosensibilité) chez *D. discoideum* ?
- Quel est le degré de généralité des observations faites sur les cellules végétatives de *D. discoideum* dont la motilité est induite par un flux ? En particulier, que nous apprennent-elles sur la motilité lors du chimiotactisme, chez *D. discoideum* et dans d'autres espèces ?

6.1 Localisation et nature possible de la cible du calcium extracellulaire impliqué dans la motilité induite par un flux

Le calcium extracellulaire active-t-il une cible extra ou intracellulaire ? L'inhibition par des chélateurs du calcium et le gadolinium ne permet pas de lever l'ambiguïté : le gadolinium pourrait agir directement sur la cible extracellulaire, même s'il est connu pour bloquer les canaux calciques. L'existence d'une cible intracellulaire est par contre vraisemblable au vu de

l'effet de l'inactivation du récepteur à l' IP_3 . Ce récepteur relâche en effet du calcium dans le cytosol en réponse à la liaison d' IP_3 .

Nous avons vu que la présence de calcium extracellulaire augmente la taille des protrusions lors de l'étalement et stimule à la fois les protrusions et les rétractions lors de la motilité. Le calcium joue donc probablement un rôle dans l'amplification du cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. Cette hypothèse est justifiée par l'effet, dans les expériences d'étalement, de la cytochalasine A (CytA), une drogue qui empêche la polymérisation de l'actine en se fixant aux extrémités des filaments d'actine. En effet, une concentration supérieure de CytA est nécessaire pour stopper les protrusions en présence d'un mM de calcium. Il y a donc plus d'extrémités sites de liaisons à la CytA. Il se peut que le calcium accélère la nucléation d'actine, mais plus probablement le calcium permet d'augmenter le nombre d'extrémités barbées et donc d'augmenter la cinétique de polymérisation. En effet, le calcium augmente l'activité de la gelsoline, une protéine qui empêche la croissance exagérée des filaments d'actine et ainsi favorise l'apparition de nombreux filaments et densifie le réseau d'actine (Fechheimer and Zigmond, 1993; Kiselar et al., 2003). Kiselar a démontré par spectroscopie de masse que la gelsoline s'active en changeant de structure lorsque le calcium se lie à des sites spécifiques (figure 6.1).

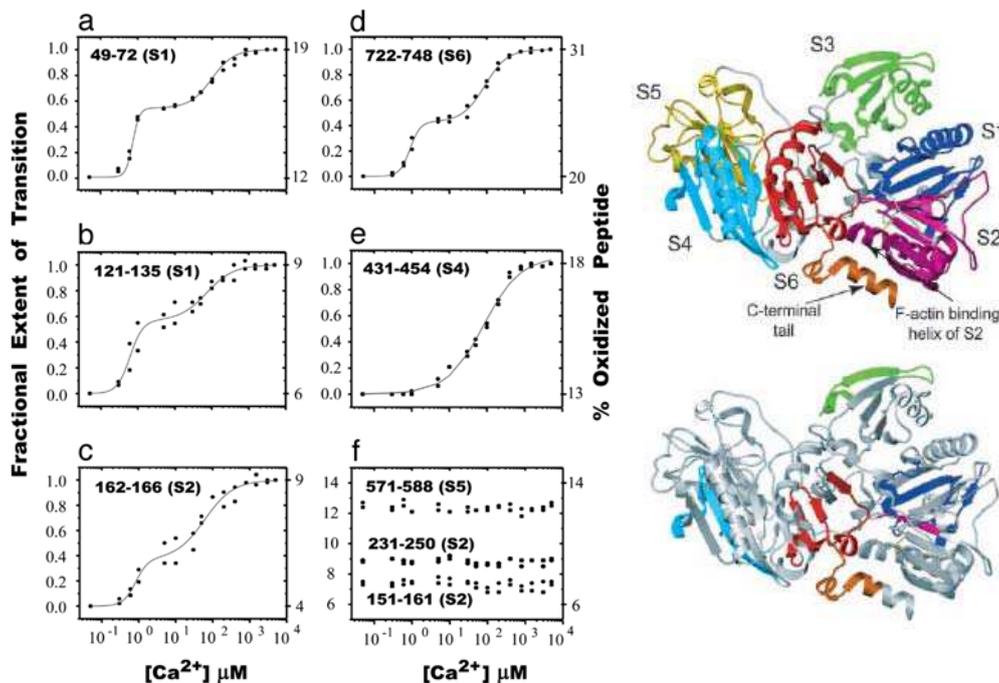


Fig 6.1 : A gauche : structure tridimensionnelle de la gelsoline. En haut, les différentes sous unités sont représentées en couleur, et les liaisons en gris. En bas, sont représentés en couleur les sept peptides sensibles au calcium qui induisent des changements de conformation de la gelsoline. A droite : changement de l'oxydation (axe des ordonnées à droite) et donc de structure (axe des ordonnées à gauche) des résidus peptidiques liant le calcium chez la gelsoline (a-e). La figure f montre les résidus ne changeant pas de conformations avec leur liaison au calcium. (Fechheimer and Zigmond, 1993; Kiselar et al., 2003)

Les courbes de la figure 6.1 montrent l'existence de deux transitions en fonction de la concentration de calcium, l'une à 1 μM , l'autre à 100 μM . Ditsch démontre que le calcium se lie spécifiquement à la gelsoline et favorise l'apparition du complexe actine/gelsoline. In vitro, la gelsoline favorise la nucléation de l'actine en train de polymériser (figure 6.2). Il est intéressant de voir que l'affinité apparente du calcium à la formation du complexe actine/gelsoline est de 25 μM .

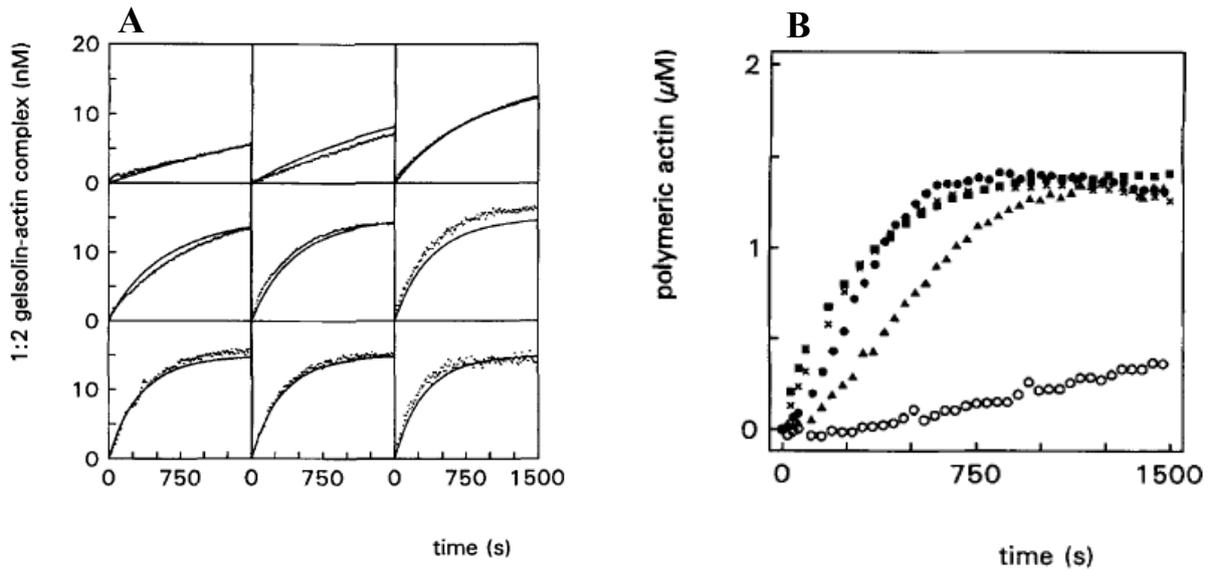


Fig 6.2 : **A.** vitesse de formation du complexe gelsoline/actine à différentes concentrations de calcium : de gauche à droite et de haut en bas, $[\text{Ca}] = 2.5, 4.8, 13, 25, 45, 80, 150, 250, 400 \mu\text{M}$. $K_d = 25 \mu\text{M}$. Les courbes pleines sont les fits. **B.** Effet du calcium sur la nucléation de l'actine-F par la gelsoline. $[\text{Ca}]$ Ronds vides : 0,9 μM . Triangles : 7 μM . Ronds pleins : 10 μM . Croix : 25 μM . Carrées : 200 μM . (Ditsch and Wegner 1995)

Kinosian montre que la gelsoline permet également de couper les filaments d'actine plus efficacement, et favorise également la dépolymérisation d'actine, et cela est d'autant plus efficace que la concentration de calcium est élevée (figure 6.3). On trouve d'ailleurs une grande concentration de gelsoline dans les protrusions, qui sont plus grandes en présence de calcium (Ditsch and Wegner, 1995; Kinosian et al., 1998; Pantaloni et al., 2000) La gelsoline présente bien les caractéristiques requises, elle est activée par le calcium, et favorise le turnover de l'actine. Chez *D. discoideum*, la gelsoline a trois homologues. Le plus proche est la severine (Eichinger et al., 1999).

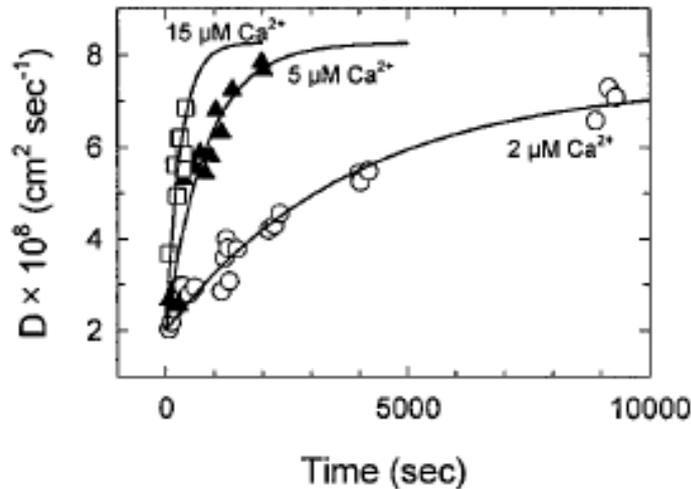


Fig 6.3 : effet de l'addition de $0,25 \mu\text{M}$ de gelsoline à une solution de $5 \mu\text{M}$ d'actine-F. La figure représente le coefficient de diffusion de l'actine filamenteuse en fonction du temps à différentes concentrations de calcium. Le coefficient de diffusion, obtenu par diffusion quasi élastique de lumière, est inversement proportionnel à la taille des polymères. Plus il y a de calcium, plus la taille des polymères diminue rapidement. Le calcium augmente la cinétique de la réaction de clivage (Kinosian et al. 1998).

6.2 Régulation de la vitesse cellulaire par le calcium extra et intra cellulaire

Toutes les expériences réalisées vont dans le même sens, et montrent qu'une perturbation des flux calciques modifie la vitesse cellulaire sans affecter son orientation.

Dans les cellules en général, la concentration de calcium cytosolique fluctue sous l'action de flux antagonistes. D'une part, l'ouverture de canaux calciques situés sur la membrane plasmique ou sur des compartiments jouant le rôle de réservoir interne de calcium (par exemple les stocks internes du réticulum endoplasmique) permet l'entrée de calcium et augmente la concentration cytosolique. D'autre part, des pompes situées sur ces mêmes compartiments utilisent l'énergie de l'ATP pour pomper le calcium hors du cytosol. De plus, chez les vertébrés, il a été montré l'existence de flux calciques évoqués et de relâchement de calcium induit par le calcium (CICR, figure 6.4). Le premier phénomène correspond à une entrée de calcium extracellulaire en réponse à la diminution de la concentration de calcium dans le réticulum endoplasmique, consécutive à une libération de calcium du réticulum vers le cytosol. Le deuxième phénomène correspond à une libération de calcium par les stocks internes en réponse à une entrée de calcium extracellulaire (Barritt, 1999).

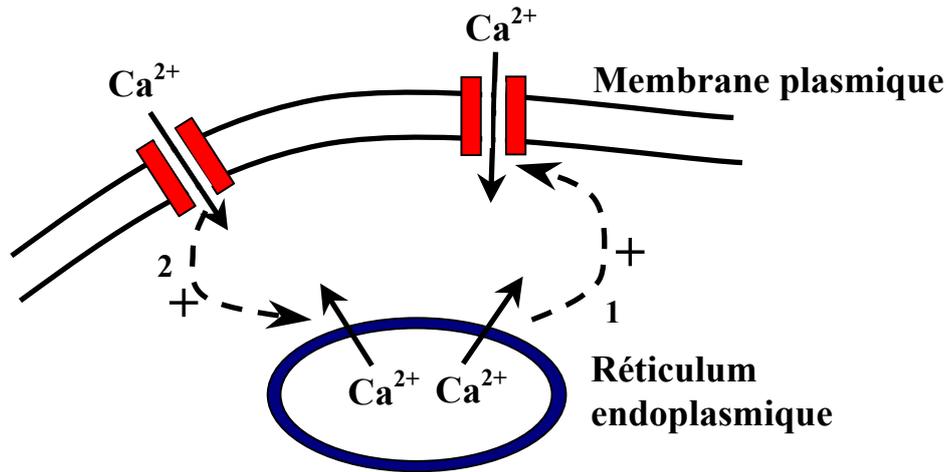


Fig 6.4 : Modèle des flux de calcium entre le cytosol, le réticulum endoplasmique et l'extérieur de la cellule. 1 : flux évoqués. 2 : CICR.

Dans le cas de la motilité de *D. discoideum*, nous avons observé que l'application de gadolinium, même en présence d'une concentration de calcium dix fois supérieure, bloque le mouvement. Le gadolinium est un analogue du calcium connu pour bloquer les canaux calciques de la membrane plasmique. De plus, l'augmentation de la concentration extracellulaire de calcium à contrainte constante se traduit par l'accélération des cellules. Ces résultats suggèrent fortement que des canaux calciques existent dans la membrane plasmique de *D. discoideum* et sont actifs lors du mouvement cellulaire.

L'inactivation des protéines G hétérotrimériques dans le mutant nul $G\beta\Delta$ rend les cellules insensibles aux variations de la concentration de calcium extracellulaire. Nous avons également vu que les cellules dépourvues de récepteurs à l' IP_3 (R- $IP_3\Delta$) ont une sensibilité aux variations de la concentration de calcium réduite par rapport aux cellules sauvages. A contrainte donnée, il faut 20 fois plus de calcium aux cellules R- $IP_3\Delta$ pour les stimuler de la même façon que la souche parentale AX2. Ces résultats montrent que les protéines G hétérotrimériques sont en amont du récepteur à l' IP_3 et des canaux calciques de la membrane plasmique (à cause du phénotype d'insensibilité au calcium plus prononcé) et que dans les cellules sauvages, la sensibilité au calcium est amplifiée par des récepteurs à l' IP_3 .

Chez *D. discoideum*, l' IP_3 est produit par deux voies de signalisation. L'une dépend de l'unique isoforme de la PLC, qui est de type δ , c'est-à-dire activée par le calcium (Drayer et al., 1994; Rebecchi and Pentylala, 2000), mais pas directement par les protéines G hétérotrimériques. L'autre vient de la dégradation de l' IP_5 par l'action d'une phosphatase, qui semble être sous le contrôle d'une protéine G hétérotrimérique (sous-unité $G_{\alpha 2}$, (Van Dijken

et al., 1997)). Il a d'autre part été montré que l'addition d'IP₃ provoque la libération de calcium par des compartiments intracellulaire de *D. discoideum* (Schaloske et al., 2000), même s'il n'a pas été démontré que cette activité est due au récepteur à l'IP₃ que nous avons étudié.

Compte-tenu des observations que nous avons faites et des connaissances biochimiques actuelles sur *D. discoideum*, nous pouvons proposer deux schémas fonctionnels.

- Dans le premier schéma, les protéines G hétérotrimériques stimulent la production d'IP₃, ce qui conduit à la libération de calcium par les stocks internes et à l'entrée de calcium extracellulaire par un mécanisme de flux calciques évoqués. C'est le schéma suggéré par Traynor et al., qui montrent que l'inactivation du gène *iplA* (cellules R-IP₃Δ) conduit à une forte réduction de l'entrée de calcium consécutive à une stimulation par l'AMPc ou le folate.
- Dans le deuxième schéma, les protéines G hétérotrimériques contrôlent l'entrée de calcium extracellulaire, qui active la PLCδ, ce qui stimule la production d'IP₃ et conduit à la libération de calcium des stocks internes. C'est un mécanisme de relâchement de calcium induit par le calcium (CICR). Ce schéma nous semble plus probable, car chacune des étapes a été démontré expérimentalement chez *D. discoideum*, dans les cellules végétatives. De plus, le premier schéma n'explique pas la sensibilité résiduelle au calcium des cellules R-IP₃Δ.

Ce deuxième schéma (figure 6.5) est testable expérimentalement. En effet, un mutant d'inactivation de la PLCδ est disponible au Dicty stock center. La prédiction du schéma 2 est qu'il se comporterait de manière analogue au mutant R-IP₃Δ. Selon le schéma 1, sa motilité devrait être équivalente à celle de la souche sauvage. De plus, il existe deux gènes dans la banque de *D. discoideum*, qui codent très vraisemblablement pour des canaux transmembranaires spécifiques du calcium (JC2V2_0_00823 et BC5V2_0_00938 – Dictybase.org). il sera donc possible de réaliser l'inactivation de ces gènes. La prédiction du schéma 2 est que leur phénotype de motilité sera équivalent à celui des mutants GβΔ (selon le schéma 1, il devrait être équivalent au mutant R-IP₃Δ).

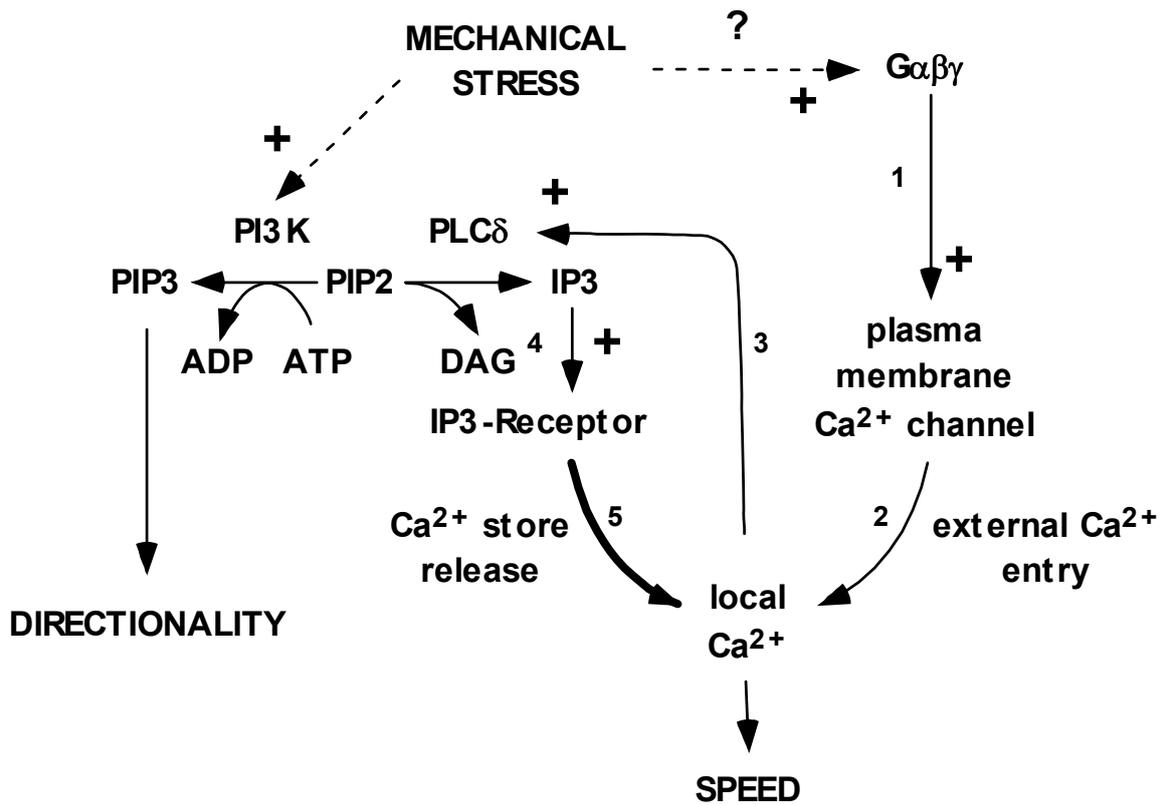


Fig 6.5 : voies de signalisation chez *Dictyostelium* induites par un flux. Les différentes voies de signalisation moléculaires stimulées par la contrainte de cisaillement sont représentées, et un schéma est proposé pour les relier entre elles.

6.3 Rôle joué par le calcium dans la mécanosensibilité cellulaire. Origine de la mécanosensibilité chez *Dictyostelium* discoideum

La vitesse et l'orientation des cellules sont deux phénomènes différents. Les cellules mutantes dépourvues de protéines G hétérotrimériques fonctionnelles sont insensibles au calcium en ce qui concerne leur vitesse. Par contre on est sûr qu'elles sentent toujours les forces, puisqu'elles s'orientent dans le sens du flux dès l'application d'une contrainte de cisaillement. Ainsi, ni la concentration de calcium ni l'activation des protéines G n'est nécessaire à l'orientation cellulaire, donc à la polarisation. En revanche, on sait que l'activation de la PI3K (voir figure 1.18) est nécessaire à la sensibilité directionnelle, mais pas à la stimulation de la vitesse par la contrainte de cisaillement (Decave et al., 2003).

Les protéines G n'activent donc pas la PI3K lors de la réponse au flux. Cela suggère qu'il y a deux voies de signalisation différentes lorsque les cellules sont soumises à un flux : une voie met en jeu les protéines G hétérotrimériques, ce qui permet l'utilisation du calcium externe et

contrôle la vitesse de la cellule, et l'autre voie active la PI3K qui permet la production d'un gradient de PIP₃ qui contrôle l'orientation cellulaire en réponse à une force. Il est intéressant de noter que le PIP₂ est au croisement des deux voies de signalisation. L'activation de la PI3K permet la phosphorylation du PIP₂ en PIP₃, et le PIP₂ est également dégradé en IP₃ via l'activation de la phospholipase C, qui elle-même est activée par le calcium cytosolique (figure 6.5).

Nous avons utilisé l'application d'une contrainte hydrodynamique pour mettre en évidence le rôle du calcium dans la motilité des cellules végétatives de *D. discoideum*. Nous avons montré que la présence de calcium augmente l'intensité de la réponse cellulaire aux forces de cisaillement. En ce sens, l'entrée de calcium et les protéines G hétérotrimériques sont impliquées dans la mécanosensibilité de *D. discoideum*. Cette sensibilité accrue aux forces explique aussi pourquoi la motilité spontanée de *D. discoideum* augmente avec le calcium extracellulaire, en l'absence de contraintes hydrodynamiques appliquées. En effet, les cellules exercent elles-même des forces, auxquelles, par réaction, elles peuvent être sensibles.

Enfin, de même que les cellules en mouvement soumises à une force (2,4 Pa), la période des protrusions et des rétractions lors de l'étalement cellulaire est également invariante quels que soient le type cellulaire ou la concentration de calcium. Mais sa valeur n'est pas de l'ordre de 10 secondes mais de 25 à 30 secondes. La période des oscillations dépend donc vraisemblablement de la valeur de la contrainte de cisaillement appliquée. Décavé a montré que la fréquence des protrusions augmente avec la contrainte appliquée (2003). De plus, il a été rapporté que les fluctuations d'aire pour une cellule *D. discoideum* en mouvement sur un substrat élastique présentent des oscillations de période beaucoup plus grande (Uchida et al., 2003). Les auteurs ont mesuré une période chez les cellules sauvages de 70 ± 30 secondes (figure 6.6). Il est tentant de rapprocher la période du cycle gain/perte de surface des oscillations des protrusions et des rétractions que nous rapportons.

La période des oscillations dépend donc peut-être également des possibilités qu'a la cellule pour exercer correctement des forces sur le substrat d'adhésion, c'est-à-dire localement de la tension membranaire.

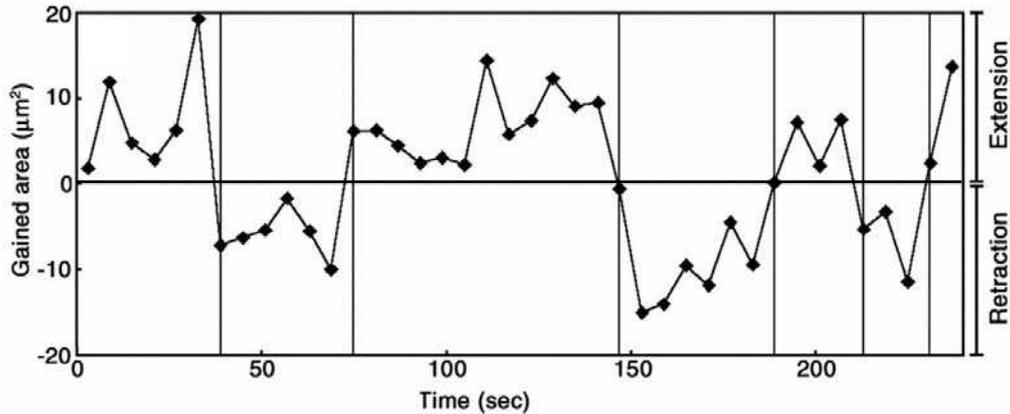


Fig 6.6 : Fluctuation de l'aire totale de *Dictyostelium* en motilité exploratrice. On observe plusieurs fréquences : une qui mesure la fréquence du cycle gain/perte de surface, et l'autre qui semble montrer qu'il y a plusieurs protrusions et rétractions à l'intérieur d'une phase de gain (ou perte) de surface. La première est de l'ordre de 70 secondes, la seconde est comprise entre 20 et 30 secondes (Uchida et al. 2003).

Quel lien peut exister entre les forces de cisaillement, l'entrée de calcium extracellulaire et les protéines G hétérotrimériques ? Il paraît peu vraisemblable que la tension membranaire active directement, par étirement, des canaux transmembranaires. En effet, les cellules répondent à des forces très faibles (50 pN) bien inférieures à celles nécessaires pour ouvrir les canaux mécanosensibles des procaryotes ou des eucaryotes (Hamill and Martinac, 2001). De plus cela n'expliquerait pas le rôle des protéines G hétérotrimériques. Il est plus vraisemblable de penser que la sensibilité aux forces de cisaillement reflète l'implication des protéines G et du calcium dans la réponse cellulaire au contact. C'est ce qui est vu directement dans les expériences d'étalement. Il semble donc possible que les protéines G hétérotrimériques et l'entrée de calcium soient sous le contrôle d'une protéine d'adhésion encore non identifiée.

6.4 Comparaison entre les cellules végétatives et développées de *Dictyostelium discoideum* et d'autres types cellulaires

Le comportement de *D. discoideum* est complexe, puisque pour des contraintes supérieures à 0,6 Pa, les cellules vont dans le sens du flux, mais pour des contraintes inférieures, les cellules adoptent un comportement bi-directionnel : une partie des cellules remontent le flux. *D. discoideum* englobe ainsi les comportement de différents types cellulaires : le mouvement des kératocytes est dans le sens de la force appliquée (figure

6.7(Verkhovsky et al., 1999)) contrairement au fibroblastes, qui s'opposent à la force en renforçant les points focaux d'adhésion (voir figure 1.15(Riveline et al., 2001)).

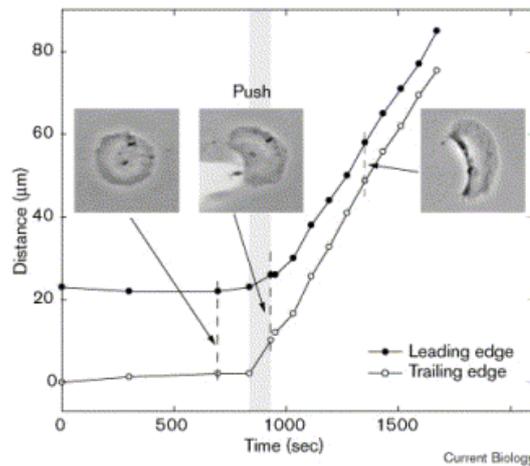


Fig 6.7 : L'application d'une force sur un kératocyte déclenche un mouvement orienté, dans le sens de la force. Ainsi la cellule se polarise.

Ce comportement bi-directionnel montre qu'il y a une relation complexe entre la tension membranaire et la vitesse des bords cellulaires. Deux assemblages moléculaires incompatibles biochimiquement et mécaniquement sont recrutés aux bords cellulaires, qui permettent les rétractions et les protrusions. Nos résultats montrent que la force appliquée aux cellules et la tension membranaire affectent les caractéristiques et la dynamique du cytosquelette d'actine.

Qu'en est-il du rôle du calcium dans la réponse mécanique des autres cellules et dans d'autres modèles expérimentaux de motilité cellulaire ?

Chez les kératocytes en mouvement, l'application d'une force de cisaillement sur la membrane des cellules, en déformant le substrat sur lequel elles adhèrent, induit une augmentation du taux de calcium dans les cellules (Lee et al., 1999). Sur la figure 6.8, les auteurs montrent que l'augmentation de la concentration de calcium interne chez les kératocytes, en réponse à une force de cisaillement sur la membrane.

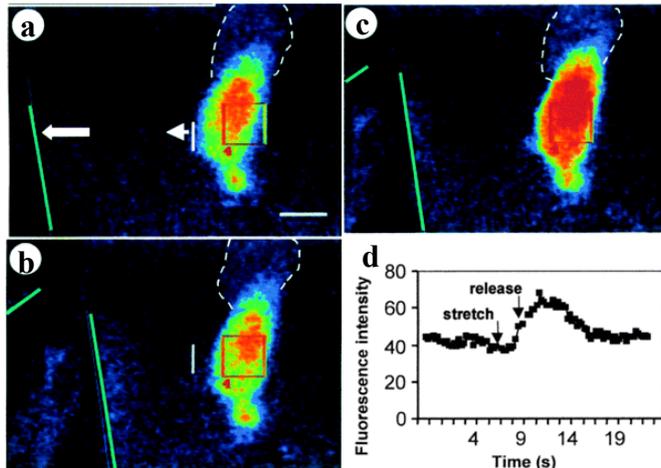


Fig 6.8 : Augmentation de $[Ca]_i$ en réponse à une force de cisaillement. Echelle : $10 \mu m$. **a**, une micro-aiguille étire le substrat élastique (ligne verte) pour déformer la cellule dans la direction de la flèche. **b**, deux sec après, on arrête l'application de la force (la barre blanche verticale repère le mouvement du corps cellulaire). **c**, augmentation de $[Ca]$ en réponse à la déformation appliquée (changement de couleur du vert au rouge). **d**, intensité de fluorescence en fonction du temps. L'augmentation de $[Ca]$ a lieu 2 sec après la stimulation (Lee et al. 1999).

Nous n'avons pas réussi à visualiser cette entrée de calcium chez *D. discoideum*, en utilisant le calcium green I et la calcium orange, deux fluorophores qui émettent de la lumière quand ils se lient au calcium. Peut-être que les variations de concentrations de calcium sont trop faibles, ou bien trop rapides (inférieures à la seconde) : Il a récemment été observé des ondes calciques très rapides traversent les neutrophiles stimulés par le fMLP, un facteur chimiotactique (Kindzelskii and Petty, 2003). Les auteurs ont pu observer ces vagues grâce à une imagerie très sensible aux variations d'intensité de fluorescence, et un intervalle entre les images pouvant aller jusqu'à 50 ns (figure 6.9).

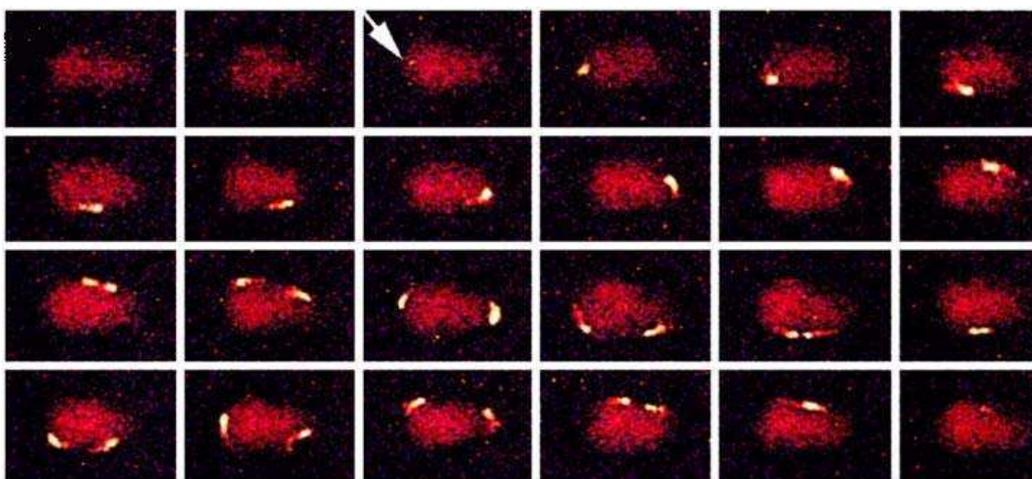


Fig 6.9 : les vagues calciques se propagent dans la région périmembranaire des neutrophiles polarisés, stimulés par 50 nM de fMLP. Le signal calcique apparaît au niveau d'une protrusion (flèche) et se propage jusqu'à ce que cette vague calcique atteigne le site de liaison au fMLP. Ensuite la vague unique devient double, et les deux vagues se propagent en sens inverse jusqu'à ce qu'elles rejoignent le site de liaison au fMLP où elles s'annihilent. 100 ns entre chaque image (Kindzelskii and Petty 2003).

Un lien entre la concentration de calcium interne et la motilité par chimiotactisme (les cellules sont polarisées par le gradient chimique) a déjà été observée chez les neutrophiles (Mandeville et al., 1995). Chez *D. discoideum*, les récepteurs à l'AMPC stimulent l'entrée de calcium (Nebl and Fisher, 1997; Schaloske et al., 2000). Nebl et al. montrent que l'ajout d'AMPC sur des cellules capables d'agréger, ou de folate sur des cellules végétatives augmente la concentration de calcium à l'intérieur des cellules (figure 6.10).

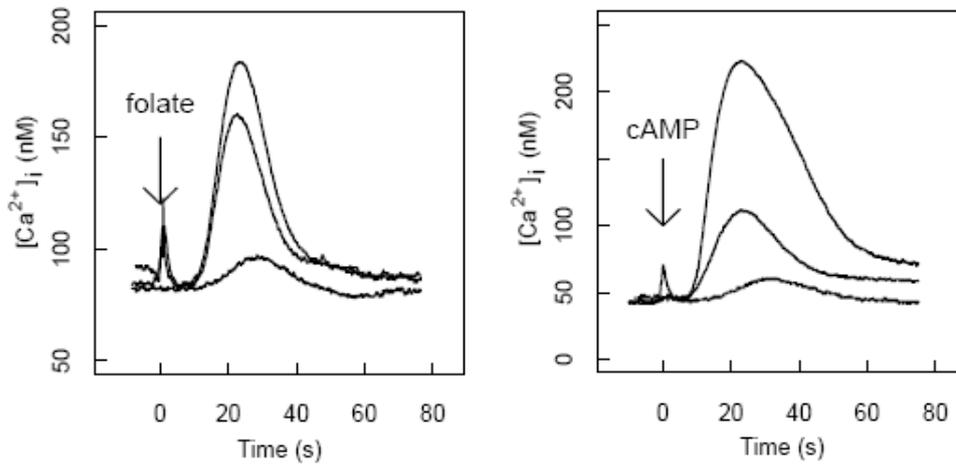


Fig 6.10 : l'ajout de chimioattractants sur des cellules sauvages déclenche une augmentation de la concentration de calcium interne (Nebl et al. 1997).

Et les auteurs montrent également que cette augmentation de calcium interne est due à un flux de calcium externe, car si on s'arrange pour enlever le calcium externe en ajoutant du BAPTA (chélateur de calcium), alors la réponse calcique aux chimioattractants n'existe plus (figure 6.11).

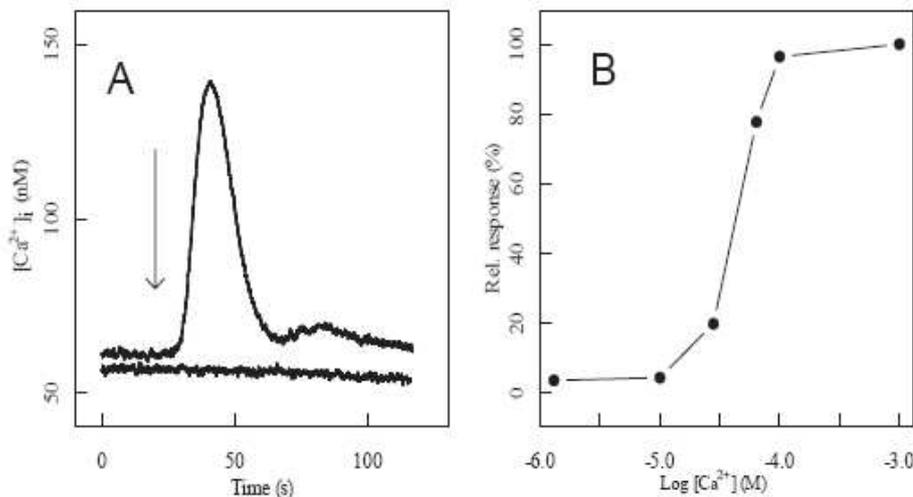


Fig 6.11 : **A.** L'ajout de BAPTA, chélateur de calcium, empêche la réponse calcique après stimulation à l'AMPC. La courbe du haut est le contrôle, la flèche représente l'instant où est ajouté l'AMPC. **B.** L'intensité de la réponse des cellules sauvage à la stimulation par l'AMPC dépend de la concentration de calcium externe. $K_d = 30 \mu M$, ce qui est la même affinité au calcium que pour la réponse en motilité des cellules à une contrainte de cisaillement (Nebl et al. 1997).

Ce sont les gradients de calcium dans la cellule qui induisent ces changements morphologiques (Unterweger and Schlatterer, 1995). En effet, les auteurs montrent que l'introduction de BAPTA dans les cellules empêche l'établissement de ces gradients calciques et il en résulte que les cellules restent arrondies et immobiles (figure 6.12).

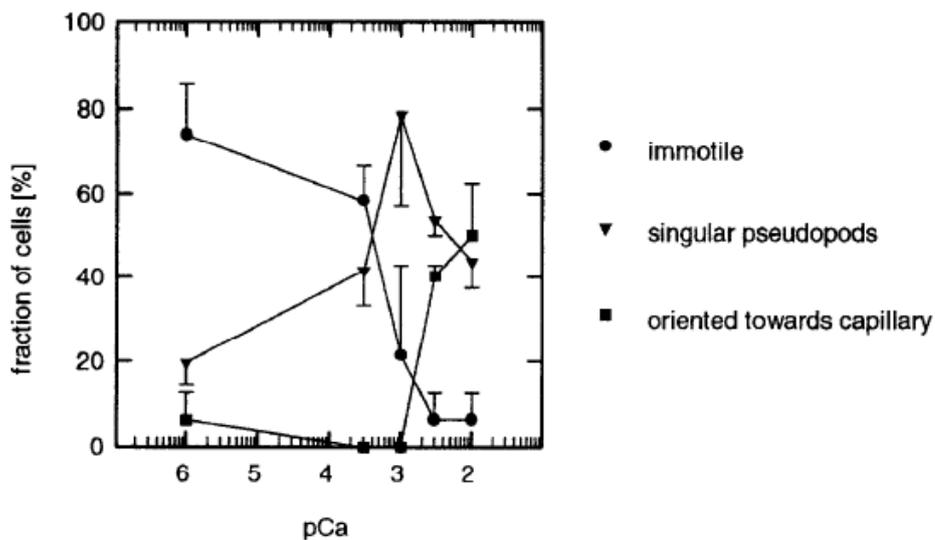


Fig 6.12 : Effet de l'addition de calcium sur les cellules avec 1 mM de BAPTA. Les cellules ont été incubées dans un tampon contenant du calcium pendant 30 minutes, puis on a analysé la réponse des cellules à un gradient d'AMPc. Il y a un effet de compétitif entre le calcium et le BAPTA : plus il y a de calcium dans le tampon, plus grandes sont les possibilités d'avoir des flux de calcium dans la cellule, plus on trouve un grand nombre de cellules motiles, stimulées par l'AMPc (Unterweger and Schlatterer 1995).

Si on élimine le relargage des stocks internes de calcium en invalidant le gène codant pour les récepteurs à l'IP₃, on diminue fortement la concentration de calcium cytosolique. Mais le chimiotactisme, la motilité et l'orientation cellulaire ne sont pas affectés (Traynor et al., 2000). Comme Traynor et al. le montrent dans la figure 6.13, les flux de calcium internes dus à la stimulation chimiotactique sont abolis chez les cellules R-IP₃Δ, mais la réponse à l'AMPc reste la même que pour les cellules sauvages.

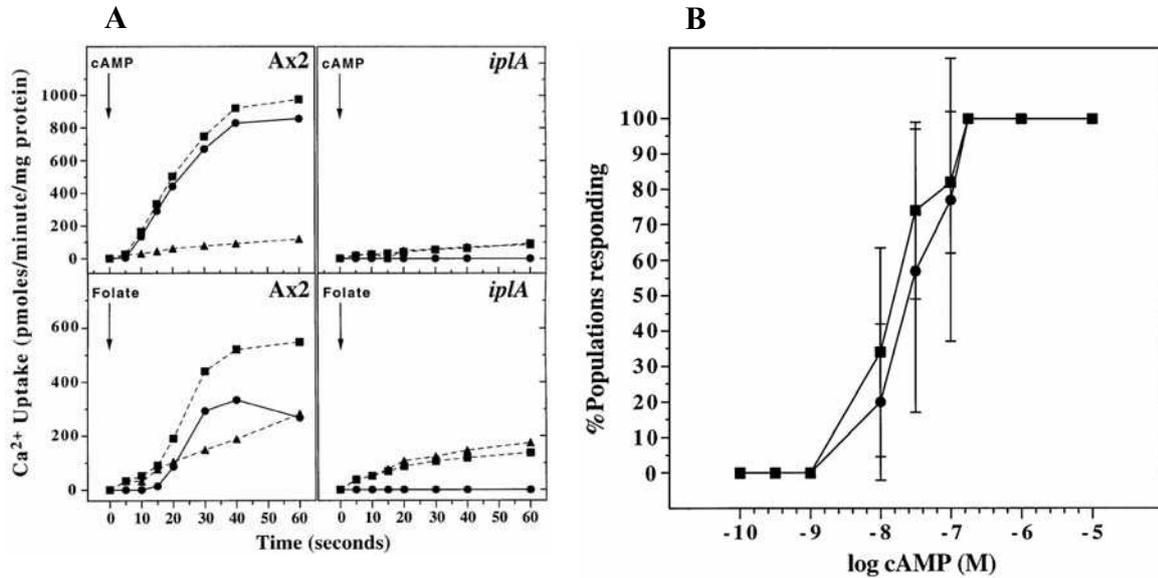


Fig 6.13 : **A.** Les flux de calcium dus à une stimulation par l'AMPc sont abolis dans les cellules $R-IP_3\Delta$ (*iplA*). Le tampon contient $100 \mu M$ de $CaCl_2$, $5 \mu Ci/mL$ de $^{45}CaCl_2$ avec (carrés) ou sans (triangles) AMPc (en haut, cellules différenciées) ou folate (en bas, cellules végétatives). Ronds pleins : flux de calcium dus au chimioattractant (différence entre les deux autres courbes). **B.** Réponse des cellules sauvages (carrés) et mutantes (ronds) à une stimulation par l'AMPc (Traynor, Milne et al. 2000).

Le calcium est uniquement impliqué dans le contrôle de la vitesse des cellules, en favorisant le renouvellement des structures d'actine, et non dans l'orientation de ces dernières et n'intervient donc pas dans les mécanismes de polarisation.

Le tableau 6.2 page suivante fait un inventaire des réponses aux forces des différents types cellulaires dont j'ai parlé dans ce paragraphe, mais également recense les protéines impliquées et celles qui sont non impliquées dans cette réponse aux forces de cisaillement.

Type cellulaire	Réponse aux forces de cisaillement	Protéines impliquées	Protéines non impliquées
<i>D. discoideum</i> végétatives	Orientation dans le sens de la force ou en opposition, suivant l'intensité de celle-ci	PI3K et Phg2 pour l'orientation, G β , R-IP $_3$ et myosine 2 pour la vitesse	
<i>D. discoideum</i> différenciées	Etude seulement en chimiotactisme	G β et PI3K pour l'orientation, myosine 2 pour la vitesse	Récepteurs à l'IP $_3$, Phg2
kératocytes	Orientation dans le sens de la force	?	
fibroblastes	Orientation dans le sens opposé à la force	Rho, mDia, myosine 2	

Tableau 6.2 : Réponse aux forces de cisaillement, et protéines impliquées ou non dans la réponse des cellules capable de motilité sur un substrat.

6.5 Dynamique des bords cellulaire et étalement sur un substrat

Le calcium externe joue un rôle très important dans la dynamique des bords cellulaires qui explique le mouvement globale de la cellule. L'entrée de calcium dans la cellule provoque des changements morphologiques : dans un premier temps, la cellule s'arrondit, puis la dynamique des bords cellulaires reprend, et plus il y a de calcium libre dans le tampon, plus les protrusions et les rétractions sont efficaces.

L'analyse des taux d'expansion et de rétraction démontre l'existence d'oscillations dans le mouvement des fronts cellulaires. La périodes des oscillations ne varie pas avec la concentration de calcium, seule l'amplitude de ces oscillations change. L'analyse des données nous montre que la période des protrusions vaut 10 secondes et celle des rétractions vaut 12 secondes. La différence entre les deux n'est pas évidente, compte tenu des écarts types de plusieurs secondes pour chacun des résultats. La théorie des petits échantillons et l'utilisation de la distribution de Student nous permet de dire que les deux périodes ont 99 chances sur 100 d'être différentes. Ceci expliquerait pourquoi les protrusions et les rétractions ne sont pas systématiquement en phase ou en opposition de phase. Cette analyse montre aussi que les protrusions et les rétractions sont bien responsables du mouvement cellulaire.

Dans le cas de la motilité cellulaire induite par un flux, la relation entre le taux d'aires gagnées ou perdues et la vitesse cellulaire est linéaire. Cela peut être interprété de la façon suivante : parmi les protrusions et rétractions observées, certaines sont efficaces et permettent le mouvement, et d'autres sont indépendantes du mouvement. On peut écrire cette équation linéaire représentant la variation de surface par seconde en fonction de la vitesse moyenne comme suit :

$$\frac{dA}{dt} = \left(\frac{dA}{dt} \right)_0 + L.v$$

$(dA/dt)_0$ est le terme qui renvoie aux protrusions et rétractions inefficaces, v est la vitesse moyenne des cellules, tous types cellulaires confondus, et L est une longueur qui relie la vitesse cellulaire aux taux d'expansion et de rétraction. C'est la largeur de la protrusion ou de la rétraction dans la direction du mouvement. Nos mesures nous permettent d'évaluer $(dA/dt)_0$ à $0,85 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$, se qui est de l'ordre de grandeur des plus petits pics enregistrés, et L vaut $9 \pm 0,5 \mu\text{m}$, ce qui correspond à peu près au quart du périmètre de la zone de contact. C'est logique, puisque la cellule étant polarisée, il n'y a ni rétractions ni protrusions sur les côtés où aucune force n'est exercée (la moitié du contour). Sur l'autre moitié apparaissent à un bord cellulaire les protrusions (dans le sens du flux) et les rétractions sur le bord opposé. Pour les cellules sauvages, l'augmentation de la concentration de calcium augmente la dynamique des protrusions et des rétractions, ce qui implique une augmentation de la vitesse moyenne des cellules. La période des oscillations est presque invariante et elles ne contribuent pas aux changements de la vitesse. Nous pouvons également exclure un certain nombre de protéines dans les mécanismes d'oscillations, comme les protéines G hétérotrimériques et les récepteurs à l' IP_3 . On observe également des oscillations dans le cas de l'étalement pur (pas de rétractions), et chez les cellules *Myo2null*. Cela montre que les oscillations apparaissent lors du cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine, sans aucune intervention de la myosine 2, responsable des rétractions.

L'étalement cellulaire ne peut être dissocié de l'adhésion cellulaire sur un substrat. Le calcium externe joue un rôle sur l'adhérence pour des concentrations faibles, c'est-à-dire $[\text{Ca}] < 10 \mu\text{M}$. Le calcium est nécessaire et permet l'adhésion cellule-substrat. En effet, l'ajout d'EGTA dans le tampon (qui diminue fortement la concentration de calcium libre) réduit le nombre de cellules adhérentes sur le substrat, quand une contrainte de cisaillement est

appliquée. Il y a une compétition entre l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-substrat dans la chambre à flux, quand la concentration cellulaire est supérieure à $1,5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Cela suggère l'existence d'un même récepteur moléculaire pour l'adhésion cellule-substrat et le contact inter-cellulaire, qui pourrait être DdCAD-1, une protéine de la famille des cadhérines calcium dépendantes (Chadwick et al., 1984; Knecht et al., 1987; Wong et al., 1996). L'absence de cette protéine empêche l'agrégation des cellules dans des conditions développementales (figure 6.14). Wong et al. montrent que des cellules seules s'agrègent en présence de DdCAD-1, mais pas en l'absence de cette protéine.

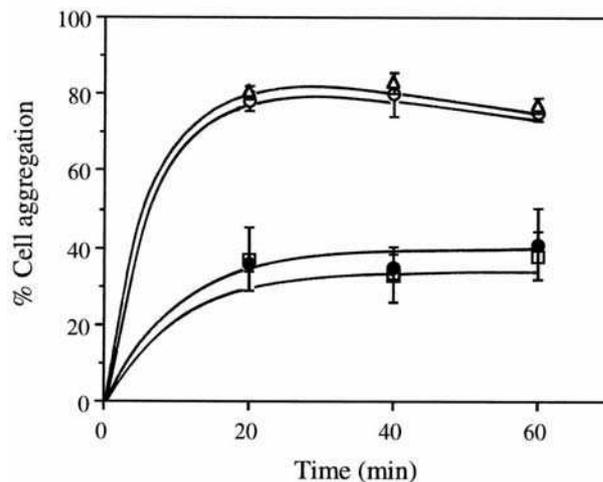


Fig 6.14 : Inhibition de l'agrégation cellulaire par DdCAD-1. Ronds vides : contrôle. Ronds pleins : GST-DdCAD-1. Triangles : GST. Carrés : DdCAD-1. Tampon SB à pH 6,4 et $2,5$ cellules/mL (Wong et al. 1996).

Il est intéressant de voir que DdCAD-1 interagit avec la taline (Niewohner et al., 1997), protéine essentielle à l'adhésion de *D. discoideum* : les mutants taline nuls n'adhèrent pas sur le substrat (résultats non montrés).

On peut également noter la taille importante des barres d'erreur dans les courbes moyennes d'étalement avec et sans calcium. Mais ceci peut être à notre avantage : si les barres d'erreur sont grandes, c'est qu'elles contiennent des informations qui n'apparaissent pas dans une première analyse. Il serait intéressant d'étudier physiquement ces perturbations, dépendantes d'un nombre important de paramètres inclus dans le modèle, comme différentes longueurs caractéristiques (épaisseur du cytosquelette, taille de la ceinture adhésive, limite membrane attachée/détachée du cytosquelette, épaisseur de la membrane) ou différents coefficients (élasticité de la membrane ou du substrat).

L'étalement cellulaire ne dépend que de la polymérisation d'actine, alors que le mouvement réclame également l'activation de la myosine 2, qui permet les contractions et rétractions des bords cellulaires via la formation du complexe acto-myosine (Uchida et al., 2003). Les auteurs montrent que les cellules dépourvues de myosine 2 peuvent émettre des protrusions, mais sont incapables de rétracter l'arrière (figure 6.15).

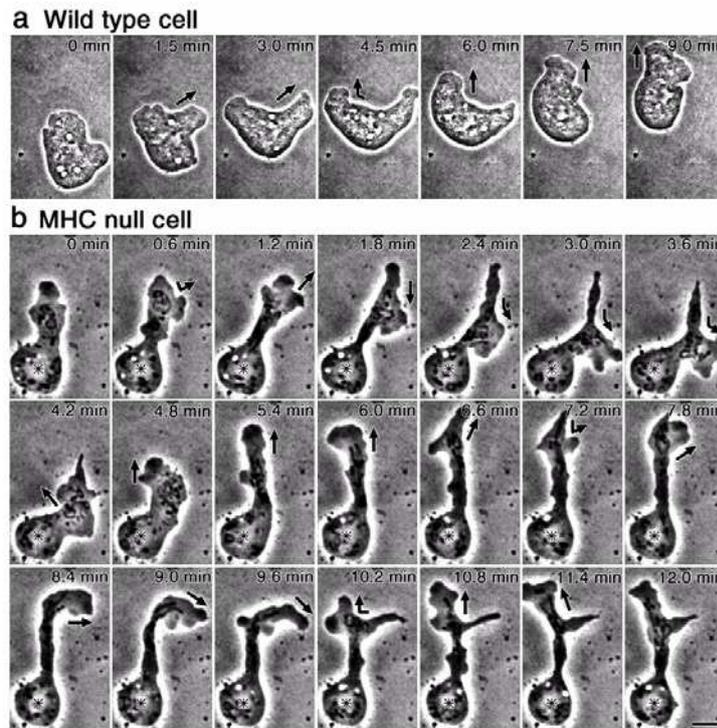


Fig 6.15 : migration cellulaire sur un substrat élastique : les cellules sauvages ont une motilité normale, avec des protrusions et des rétractions, alors que les cellules MHC null ne sont pas capables de faire des rétractions et de se mouvoir, bien qu'elles soient capables d'émettre des protrusions. Les flèches représentent la direction prise par une protrusion (Uchida et al. 2003).

C'est ainsi que la cellule peut exercer des forces sur le substrat. La cellule est capable de s'étaler à faible concentration de calcium. L'augmentation de la concentration de calcium externe augmente la cinétique de l'étalement et la surface de contact totale. Pour de fortes concentrations de calcium, l'étalement cellulaire est à la fois plus régulier et présente moins de fluctuations, ce qui va dans le sens d'un turnover des filaments d'actine plus rapide et de protrusions plus larges. Cependant, nous remarquons un phénomène paradoxal dans le taille des protrusions chez les cellules sauvages : l'amplitude des oscillations est plus grande chez les cellules en étalement que chez les cellules en mouvement, alors que la tension membranaire y est a priori moins forte. Cela suggère que la signalisation induite par le contact

s'atténue lorsque la cellule est déjà étalée. En tous cas, ceci renforce l'idée que l'étalement et la motilité cellulaires sont deux phénomènes différents.

L'étude de l'étalement des cellules $G\beta\Delta$ montre que l'existence des protrusions n'est pas due à l'activation des protéines G hétérotrimériques. La polymérisation de l'actine se fait via une autre voie de signalisation que celle utilisant l'activation des protéines G, les cellules $G\beta\Delta$ pouvant s'étaler. Ceci tend à confirmer que les protéines G permettent uniquement l'entrée de calcium dans la cellule en activant les canaux calciques transmembranaires.

L'étude de l'étalement des cellules $Myo2null$ nous apporte des éléments de réponse concernant l'apparition des rétractions et des protrusions : les protrusions initient la rétraction ou est-ce l'inverse ? D'une part la cellule, incapable de faire des rétractions, n'est pas motile, ce qui montre bien que les rétractions sont indissociables des protrusions dans le mouvement cellulaire. D'autre part, contrairement aux cellules sauvages, la cinétique de l'étalement des cellules $myosin2null$ ou la surface totale atteinte par ces dernières n'évoluent pas quelle que soit la concentration de calcium. La taille des protrusions reste toujours la même, alors que l'étalement ne dépend que de la polymérisation d'actine, dont le turnover est amélioré par le calcium. Si les cellules dépourvues de myosine 2 ne s'étalent pas plus vite en présence de calcium, c'est peut-être que la taille des protrusions est régie par celle des rétractions.

Il est aussi tout à fait remarquable que lors de l'étalement, les cellules sauvages sont polarisées : l'étalement est manifestement directionnel. En revanche, les cellules dépourvues de myosine 2 ne le sont pas durant l'étalement et les protrusions apparaissent partout. Les protrusions et les rétractions sont deux assemblages moléculaires incompatibles qui n'apparaissent jamais au même endroit en même temps, et toujours dans la direction du mouvement. La localisation du PTEN sur les côtés de la cellule (loin des fronts avant et arrière) empêche l'apparition d'actine filamenteuse (Li et al., 2003; Meili and Firtel, 2003; Xu et al., 2003). La présence de la myosine 2 est peut-être nécessaire au contrôle spatial du PTEN. Plus probablement : chez les cellules sauvages, les propriétés exclusives des fronts avant et arrière de la cellule sont générées par des voies de signalisation parallèles, plus précisément des boucles de rétroaction négatives (figure 6.16(Li et al., 2003)). Si on supprime la myosine 2, peut-être le front arrière ne peut plus envoyer de signal empêchant l'apparition de protrusions sur tous les bords de la cellule.

Chez les cellules sauvages en étalement on observe parfois un phénomène d'overshoot, c'est-à-dire une rétraction du bord cellulaire en expansion, à la fin de l'étalement. On ne l'observe

200 à 300 μm^2 , soit une surface totale de 400 à 600 μm^2 au moins, alors que la distribution des tailles ne change pas expérimentalement. Il manque donc de la membrane si on considère que celle-ci n'évolue pas. Nous avons deux hypothèses pour expliquer cette différence de résultats entre le calcul théorique de la surface de la membrane et la mesure par RICM.

- On peut penser que la membrane est froissée, qu'il existe de nombreuses invaginations. Lors de l'étalement, la force exercée sur la membrane la déplie, et on peut ainsi expliquer que la membrane disponible soit bien plus importante que celle prévue par un calcul de surface d'une sphère.
- *D. discoideum* est un organisme endocytaire, c'est-à-dire qu'il peut internaliser des éléments extérieurs comme des molécules, des solides extracellulaires ou du liquide et les contenir dans les vésicules issues de la déformation de la membrane plasmique. Le matériel internalisé peut ensuite soit suivre un cheminement intracellulaire impliquant une dégradation, soit simplement être recyclé vers la membrane plasmique. Il y a donc peut être un trafic membranaire vers les zones en train de faire contact avec le substrat. Mais il faudrait s'assurer que l'aire gagnée par exocytose est la même que celle gagnée par endocytose.

6.6 Perspectives

Il reste cependant des points qui ne sont pas clairs et qui demande à être approfondis.

Nous avons essayé de visualiser les variations de concentration de calcium dans les cellules, en les électroporant avec un fluorophore. Nous avons essayé avec le calcium green I et le calcium orange, qui ont tous les deux une constante de dissociation de 190 nM, mais qui sont excités et émettent à des longueurs d'ondes différentes. Nous avons seulement réussi à voir l'activité de la vacuole contractile.

Le problème vient probablement du fait que l'intervalle entre chaque image, durant l'acquisition, était trop long, de l'ordre de la seconde. Si les vagues calciques observées par Kindzelskii dans les neutrophiles existent aussi chez *D. discoideum*, il faut refaire des expériences en prenant un intervalle de temps de l'ordre de quelques dizaines de microsecondes entre chaque image.

Nous avons vu dans le paragraphe 6.2 et la figure 6.4 que l'augmentation de la concentration de calcium est due en grande partie au relargage des stocks internes. On suppose qu'une entrée de calcium externe active la PLC δ , une isoforme de la phospholipase

C, ce qui permet la production d'IP₃ à partir du PIP₂, IP₃ qui va se fixer sur les récepteurs des canaux calciques dans la membrane du réticulum endoplasmique, et permettre leur ouverture. Il serait intéressant, après avoir testé les mutants R-IP₃Δ, cellules dépourvues de récepteurs à l'IP₃, de tester des cellules dont le gène qui code pour la formation de PLCδ ait été invalidé. Ces mutants devraient être incapable de relarguer les stocks internes de calcium, et leur comportement en motilité devrait ainsi être assez proche des cellules R-IP₃Δ.

Nous avons montré que l'entrée de calcium externe est nécessaire à l'établissement des flux calciques à l'intérieur des cellules, et que cette entrée de calcium se fait via l'activation des protéines G hétérotrimériques. Mais nous n'avons qu'une preuve indirecte de l'existence de canaux calciques transmembranaires, par l'utilisation du gadolinium.

Il existe chez *D. discoideum* un gène (JC2V2_0_00823 dans dictybase.org) qui d'après la séquence, est un canal cationique transmembranaire qui présente un nombre important d'homologies avec le gène PKD2 humain, qui est un canal ionique lui-même activé par un récepteur nommé PC1, codé par le gène PKD1. PC1 a également la particularité d'activer les protéines G hétérotrimériques. Si des homologues des gènes PKD 1 et 2 existent chez *D. discoideum*, il serait intéressant de tester avec les outils que j'ai développés ces mutants pour lesquels ces gènes ont été invalidés. Il serait également intéressant de rechercher chez *D. discoideum* des canaux ioniques mécanosensibles. Il semble exister chez *D. discoideum* un gène (DDB0229923 chez dictybase.org) qui code pour un tel canal, qui pourrait se limiter à prévenir des chocs osmotiques, ou peut-être être aussi sensible à la tension membranaire.

Enfin, nous avons repéré l'existence d'oscillations dans l'émission des protrusions et des rétractions. Nous avons vu que leur période ne dépend pas de la concentration de calcium ou du type cellulaire, mais plus vraisemblablement de la tension membranaire. Il faudrait faire des expériences de motilité avec les cellules sauvages et les mutants, et étudier l'évolution de la période des oscillations en fonction de la contrainte hydrodynamique appliquée.

Nous ne savons pas non plus quelle est l'origine de ces oscillations. Sont-elles dues au cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine ? Dans ce cas, des mesures de périodes des protrusions et rétractions devraient être faites sur des cellules sauvages en étalement, en empêchant la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine (par exemple, la cytochalasine A pourrait être à nouveau utilisée, ou des mutants de profiline, cofiline ou severine).

Publications

Decave, E., Rieu, D., Dalous, J., Fache, S., Brechet, Y., Fourcade, B., Satre, M. and Bruckert, F. (2003). Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *J Cell Sci* **116**, 4331-43.

Gebbie, L., Benghezal, M., Cornillon, S., Froquet, R., Cherix, N., Malbouyres, M., Lefkir, Y., Grangeasse, C., Fache, S., Dalous, J. et al. (2004). Phg2, a kinase involved in adhesion and focal site modeling in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **15**, 3915-25.

Chamaroux, F., Fache, S., Bruckert, F., Fourcade, B. (2005). Kinetics of cell spreading. *Physical Review Letters* **94**(15), article 158102.

Fache, S., Dalous, J., Engelung, M., Hansen, C., Chamaroux, F., Fourcade, B., Satre, M., Devreotes, P., Bruckert, F. (2005) Calcium mobilization stimulates *Dictyostelium discoideum* shear-flow induced cell motility. *J Cell Sci*. Sous presse

Bibliographie

Publications

Bamburg, J. R., McGough, A. and Ono, S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* **9**, 364-70.

Barritt, G. J. (1999). Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. *Biochem J* **337 (Pt 2)**, 153-69.

Benghezal, M., Cornillon, S., Gebbie, L., Alibaud, L., Bruckert, F., Letourneur, F. and Cosson, P. (2003). Synergistic control of cellular adhesion by transmembrane 9 proteins. *Mol Biol Cell* **14**, 2890-9.

Berg, J. S., Powell, B. C. and Cheney, R. E. (2001). A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* **12**, 780-94.

Bonner, J. T. (1998). A way of following individual cells in the migrating slugs of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9355-9.

Bretscher, M. S. and Aguado-Velasco, C. (1998). Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 537-41.

Carrier, M. F. (1998). Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 45-51.

Chadwick, C. M., Ellison, J. E. and Garrod, D. R. (1984). Dual role for *Dictyostelium* contact site B in phagocytosis and developmental size regulation. *Nature* **307**, 646-7.

Chamaraux, F., Fache, S., Bruckert, F. and Fourcade, B. (2005). Kinetics of cell spreading. *Phys Rev Lett* **94**, 158102.

Coates, J. C. and Harwood, A. J. (2001). Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. *J Cell Sci* **114**, 4349-58.

Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 411-44.

Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. and Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275**, 34287-92.

De La Cruz, E. M., Ostap, E. M., Brundage, R. A., Reddy, K. S., Sweeney, H. L. and Safer, D. (2000). Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers. *Biophys J* **78**, 2516-27.

- De la Roche, M. A., Smith, J. L., Betapudi, V., Egelhoff, T. T. and Cote, G. P.** (2002). Signaling pathways regulating Dictyostelium myosin II. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 703-18.
- Decave, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Fourcade, B. and Bruckert, F.** (2002). Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J* **82**, 2383-95.
- Decave, E., Rieu, D., Dalous, J., Fache, S., Brechet, Y., Fourcade, B., Satre, M. and Bruckert, F.** (2003). Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *J Cell Sci* **116**, 4331-43.
- Ditsch, A. and Wegner, A.** (1995). Two low-affinity Ca(2+)-binding sites of gelsolin that regulate association with actin. *Eur J Biochem* **229**, 512-6.
- Drayer, A. L., Van der Kaay, J., Mayr, G. W. and Van Haastert, P. J.** (1994). Role of phospholipase C in Dictyostelium: formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and normal development in cells lacking phospholipase C activity. *Embo J* **13**, 1601-9.
- Eichinger, L., Lee, S. S. and Schleicher, M.** (1999). Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* **47**, 124-34.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q. et al.** (2005). The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43-57.
- Fechheimer, M. and Zigmond, S. H.** (1993). Focusing on unpolymerized actin. *J Cell Biol* **123**, 1-5.
- Fukui, Y.** (2002). Mechanistics of amoeboid locomotion: signal to forces. *Cell Biol Int* **26**, 933-44.
- Fukui, Y., Uyeda, T. Q., Kitayama, C. and Inoue, S.** (2000). How well can an amoeba climb? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10020-5.
- Gingell, D. and Owens, N.** (1992). How do cells sense and respond to adhesive contacts? Diffusion-trapping of laterally mobile membrane proteins at maturing adhesions may initiate signals leading to local cytoskeletal assembly response and lamella formation. *J Cell Sci* **101 (Pt 2)**, 255-66.
- Grimson, M. J., Coates, J. C., Reynolds, J. P., Shipman, M., Blanton, R. L. and Harwood, A. J.** (2000). Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature* **408**, 727-31.
- Hamill, O. P. and Martinac, B.** (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* **81**, 685-740.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. and Kabsch, W.** (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-9.
- Hynes, R. O.** (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-54.

- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. and Holmes, K. C.** (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
- Kindzelskii, A. L. and Petty, H. R.** (2003). Intracellular calcium waves accompany neutrophil polarization, formylmethionylleucylphenylalanine stimulation, and phagocytosis: a high speed microscopy study. *J Immunol* **170**, 64-72.
- Kinosian, H. J., Newman, J., Lincoln, B., Selden, L. A., Gershman, L. C. and Estes, J. E.** (1998). Ca²⁺ regulation of gelsolin activity: binding and severing of F-actin. *Biophys J* **75**, 3101-9.
- Kiselar, J. G., Janmey, P. A., Almo, S. C. and Chance, M. R.** (2003). Visualizing the Ca²⁺-dependent activation of gelsolin by using synchrotron footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3942-7.
- Knecht, D. A., Fuller, D. L. and Loomis, W. F.** (1987). Surface glycoprotein, gp24, involved in early adhesion of Dictyostelium discoideum. *Dev Biol* **121**, 277-83.
- Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-69.
- Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B. and Jacobson, K.** (1999). Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* **400**, 382-6.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M. et al.** (2003). Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**, 215-27.
- Malek, A. M. and Izumo, S.** (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* **109 (Pt 4)**, 713-26.
- Mandeville, J. T., Ghosh, R. N. and Maxfield, F. R.** (1995). Intracellular calcium levels correlate with speed and persistent forward motion in migrating neutrophils. *Biophys J* **68**, 1207-17.
- Meili, R. and Firtel, R. A.** (2003). Two poles and a compass. *Cell* **114**, 153-6.
- Nebl, T. and Fisher, P. R.** (1997). Intracellular Ca²⁺ signals in Dictyostelium chemotaxis are mediated exclusively by Ca²⁺ influx. *J Cell Sci* **110 (Pt 22)**, 2845-53.
- Niewohner, J., Weber, I., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A. and Gerisch, G.** (1997). Talin-null cells of Dictyostelium are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* **138**, 349-61.
- Pantaloni, D., Boujema, R., Didry, D., Gounon, P. and Carlier, M. F.** (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol* **2**, 385-91.
- Parent, C. A. and Devreotes, P. N.** (1999). A cell's sense of direction. *Science* **284**, 765-70.

- Pollard, T. D. and Beltzner, C. C.** (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 768-74.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D.** (2001). Actin dynamics. *J Cell Sci* **114**, 3-4.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.
- Rebecchi, M. J. and Pentylala, S. N.** (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* **80**, 1291-335.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A. D.** (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* **153**, 1175-86.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M. W.** (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-31.
- Ruppel, K. M., Lorenz, M. and Spudich, J. A.** (1995). Myosin structure/function: a combined mutagenesis-crystallography approach. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 181-6.
- Ruppel, K. M. and Spudich, J. A.** (1995). Myosin motor function: structural and mutagenic approaches. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 89-93.
- Sawada, Y. and Sheetz, M. P.** (2002). Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* **156**, 609-15.
- Schaloske, R., Schlatterer, C. and Malchow, D.** (2000). A Xestospongine C-sensitive Ca(2+) store is required for cAMP-induced Ca(2+) influx and cAMP oscillations in Dictyostelium. *J Biol Chem* **275**, 8404-8.
- Schluter, K., Jockusch, B. M. and Rothkegel, M.** (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1359**, 97-109.
- Schwarz, E. C., Geissler, H. and Soldati, T.** (1999). A potentially exhaustive screening strategy reveals two novel divergent myosins in Dictyostelium. *Cell Biochem Biophys* **30**, 413-35.
- Soldati, T.** (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic* **4**, 358-66.
- Soldati, T., Geissler, H. and Schwarz, E. C.** (1999). How many is enough? Exploring the myosin repertoire in the model eukaryote Dictyostelium discoideum. *Cell Biochem Biophys* **30**, 389-411.
- Strassmaier, M. and Gillespie, P. G.** (2002). The hair cell's transduction channel. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 380-6.

- Theriot, J. A.** (1997). Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol* **136**, 1165-8.
- Traynor, D., Milne, J. L., Insall, R. H. and Kay, R. R.** (2000). Ca²⁺ signalling is not required for chemotaxis in Dictyostelium. *Embo J* **19**, 4846-54.
- Uchida, K. S., Kitanishi-Yumura, T. and Yumura, S.** (2003). Myosin II contributes to the posterior contraction and the anterior extension during the retraction phase in migrating Dictyostelium cells. *J Cell Sci* **116**, 51-60.
- Uchida, K. S. and Yumura, S.** (2004). Dynamics of novel feet of Dictyostelium cells during migration. *J Cell Sci* **117**, 1443-55.
- Unterweger, N. and Schlatterer, C.** (1995). Introduction of calcium buffers into the cytosol of Dictyostelium discoideum amoebae alters cell morphology and inhibits chemotaxis. *Cell Calcium* **17**, 97-110.
- Van Dijken, P., Bergsma, J. C. and Van Haastert, P. J.** (1997). Phospholipase-C-independent inositol 1,4,5-trisphosphate formation in Dictyostelium cells. Activation of a plasma-membrane-bound phosphatase by receptor-stimulated Ca²⁺ influx. *Eur J Biochem* **244**, 113-9.
- Van Haastert, P. J.** (1983). Sensory adaptation of Dictyostelium discoideum cells to chemotactic signals. *J Cell Biol* **96**, 1559-65.
- Verkhovsky, A. B., Svitkina, T. M. and Borisy, G. G.** (1999). Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol* **9**, 11-20.
- Weber, I., Wallraff, E., Albrecht, R. and Gerisch, G.** (1995). Motility and substratum adhesion of Dictyostelium wild-type and cytoskeletal mutant cells: a study by RICM/bright-field double-view image analysis. *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**, 1519-30.
- Wong, E. F., Brar, S. K., Sesaki, H., Yang, C. and Siu, C. H.** (1996). Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **271**, 16399-408.
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. and Keely, P. J.** (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 103-19.
- Wu, L., Valkema, R., Van Haastert, P. J. and Devreotes, P. N.** (1995). The G protein beta subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in Dictyostelium. *J Cell Biol* **129**, 1667-75.
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T. and Bourne, H. R.** (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**, 201-14.

Livres et thèses

La Biochimie, 5^{ème} édition, de **Lubert Stryer**, chez **Flammarion**

Cell movements, from molecules to motility, 2^{de} édition, de **Dennis Bray**, chez **Garland**

Dictyostelium, Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity, 2001, de **Richard H. Kessin**, chez **Developmental and Cell Biology Series**

Théorie et applications de la statistique, de **Murray R. Spiegel**, chez **Schaum**

Comportement cellulaire sous écoulement hydrodynamique : aspects expérimentaux et théoriques, thèse de doctorat de **Emmanuel Décavé**, Université **Joseph Fourier Grenoble I**, 2002

Motilité Cellulaire : quelques aspects expérimentaux et théoriques, thèse de doctorat de **François Chamaraux**, Université **Joseph Fourier Grenoble I**, 2005