



HAL
open science

Propriétés mécaniques de la myosine II in vitro: de la molécule unique aux effets collectifs.

Pierre-Yves Plaçais

► **To cite this version:**

Pierre-Yves Plaçais. Propriétés mécaniques de la myosine II in vitro: de la molécule unique aux effets collectifs.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: . tel-00410100

HAL Id: tel-00410100

<https://theses.hal.science/tel-00410100>

Submitted on 17 Aug 2009

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
PIERRE & MARIE CURIE - PARIS 6

École doctorale : Physique de la Région Parisienne

Spécialité : Interface Physique - Biologie

Présentée par :

Pierre - Yves PLAÇAIS

Sujet de la thèse :

**Propriétés mécaniques de la myosine II
in vitro : de la molécule unique
aux effets collectifs.**

Thèse dirigée par Françoise BROCHARD - WYART et Pascal MARTIN

soutenue publiquement le 6 Juin 2008 devant un jury composé de :

M. Laurent BOURDIEU

Rapporteur

M. Thomas DUKE

Rapporteur

Mme Christine PETIT

M. Denis COTE

M. Justin MOLLOY

M. Pascal MARTIN

M. Didier CHATENAY

Membre invité

M. Frank JULICHER

Membre invité

Remerciements

On pourrait croire, une fois la fatigue de la période de rédaction et la tension de la soutenance retombées, que la rédaction des remerciements est une pure formalité. Or il s'agit d'un exercice de style ardu. Parmi les questions qu'on est immanquablement amené à se poser (non classées par ordre d'importance) : "Comment vais-je les insérer dans mon document L^AT_EX?", "Comment faire pour n'oublier personne?", "Dans quel ordre hiérarchiser les noms?", "Aurai-je à ma disposition suffisamment de synonymes du verbe remercier?" ... Reculant devant ces obstacles, j'ai (trop!) longtemps repoussé ce moment, mais près de trois mois après la soutenance, il est temps de se lancer; d'autant que, comme vous pouvez le constater, j'ai déjà trouvé la réponse à la première question! Concernant la deuxième, j'essaie de faire de mon mieux, mais je prie d'avance tout lecteur qui, ne trouvant pas son nom, se sentirait offensé de n'y voir qu'une manifestation d'étourderie et non de malveillance, et d'ajouter son nom au crayon à papier à la fin de la liste. Quant à l'ordre, après tout il ne regarde que moi; vous êtes donc éventuellement en droit de m'en vouloir, mais ne perdez pas de vue que j'ai choisi d'adopter un plan plus thématique que purement hiérarchique! Enfin, pour la dernière question, chaque lecteur y apportera lui-même sa réponse.

Il est d'usage de commencer par les membres du jury. Je les remercie donc tous, à commencer par Christine Petit, Frank Jülicher, Justin Molloy, et Denis Côte, d'avoir accepté d'en faire partie et apporté par leurs questions quelques éléments de réflexion sur mon travail. Trois autres membres méritent un traitement de faveur : Didier Chatenay a été un tuteur attentif et attentionné pendant toute la durée de ma thèse, et Thomas Duke et Laurent Bourdieu, tous deux rapporteurs, reçoivent toute ma gratitude pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du manuscrit et leurs rapports favorables, voire élogieux, qui furent bienvenus après les mois arides de rédaction.

Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans l'appui de trois personnes en particulier. En premier lieu, bien sûr, Pascal Martin, qui en a proposé le sujet, m'a intégré dans son équipe et m'a offert des conditions matérielles extrêmement favorables. C'est souvent avec plaisir que j'ai bénéficié de son encadrement perfectionniste et de son investissement sans défaut dans la réalisation des différents projets. Je n'oublie pas de mentionner ici également Françoise Brochard, directrice officielle et bienveillante de ma thèse, ainsi que Jean-François Joanny, qui m'a chaleureusement accepté dans le Laboratoire "Physico-Chimie Curie" de l'Institut Curie.

Une grande partie de mes travaux a été effectuée en coopération étroite avec Martial Balland, à l'occasion de son séjour postdoctoral au laboratoire; il m'a notamment aidé à construire un dispositif expérimental performant, a initié les rudiments de compétences biochimiques de l'équipe, et surtout m'a mis le pied à l'étrier en LabView! Je remercie également, par ordre chronologique, Jean-Yves Tinevez, Jérémie Barral et Joseph Jackson, tous membres de l'équipe, pour leurs soutiens ponctuels et efficaces. Par ailleurs, je me réjouis que nos travaux expérimentaux aient pu être menés en parallèle d'une collaboration fructueuse et intensive avec le

groupe de théoriciens du laboratoire. J'exprime donc une nouvelle fois ma reconnaissance à Jean-François Joanny, mais aussi à Thomas Guérin et Jacques Prost, pour avoir consacré tant d'énergie et de temps à nos discussions.

Avant d'arriver au laboratoire, je n'avais jamais réussi à planter un clou sans me taper sur les doigts, ni à accrocher un tableau au mur de manière durable. Qui aurait cru, dans ces conditions, que je parviendrais à mener à son terme une thèse expérimentale ? C'était sans compter la présence à l'UMR 168 d'une équipe technique chevronnée : Benoît Lemaire, Michel Petit, et Gilles Rousseau à l'atelier de mécanique, et Jean-Hugues Codarbox à l'électronique. Sans leurs compétences irremplaçables, et qui font défaut à de trop nombreux laboratoires, leurs conseils avisés et leur disponibilité, les travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient assurément pas pu être menés à bien.

Quant au manuscrit lui-même, il serait constellé de fautes de frappe et de lourdeurs syntaxiques sans la relecture bienveillante et attentive de mon père, ma mère, Léa-Laetitia Pontani, Jonathan Saragosti et Guillaume Salbreux.

Il fait bon vivre à l'UMR 168...c'est certainement pour cela que les thèse y durent en moyenne plus longtemps qu'ailleurs ! En toutes circonstances, j'ai pu compter sur le soutien de mes amis et comparses thésards et postdocs, que ce soit pour une pause café, un peu de soutien dans les périodes délicates, une simple discussion, ou le plus souvent, ce qui n'a pas de prix, un grand éclat de rire. Parce qu'il faut bien un ordre, et qu'un classement en vaut un autre, merci en particulier à la "Dream Team" de la bataille Corse, Aurélie Dupont (merci aussi d'avoir supporté ma tendance bordélique dans notre bureau commun, et bravo pour tes talents d'apicultrice), Guillaume Salbreux et Jonathan Saragosti (encore eux), mais aussi aux G.O. de l'ADIC Lea-Laetitia Pontani (encore elle) et Simon De Beco, aux Viovettes (je leur dois quand même de les citer nommément : Rafaële Attia, Virginie Audonnet, Anne Le Néel, Sandrine Miserere et Laure Saias) et à leurs homologues masculins, Pierre Recouvreux, la voix de France Inter au rez-de-chaussée et Antoine-Emmanuel Saliba dont l'engagement militant est aussi sincère que désespéré ☺ ! Je n'oublie pas non plus ceux qui ont quitté le labo avant moi, Léa Trichet, Boris Guirao, Philippe Dewimille, Nicolas Desprat, mais aussi la génération précédente, Cécile Leduc, Ewa Paluch et Aurélie Dornier. Et – halte au jeunisme ! – je remercie aussi les chercheurs permanents du laboratoire qui contribuent à cette ambiance bénéfique, notamment Nelly Henry, Julie Plastino, Cécile Sykes, Jean-Louis Viovy et François Amblard. Un des souvenirs les plus marquants des ces quatre années est sans hésitation possible la scène surréaliste de Guillaume Salbreux en maillot de bain dans le hall bondé d'un hôtel londonien, au cours de ce mémorable Congrès Européen de Biophysique au mois de Juillet 2007 où nous apprîmes également comment fabriquer des lasers à base de mitochondries. Pour cet inoubliable séjour, je me devais de réserver à Guillaume une place décidément à part dans ces remerciements. Avant de clore ce paragraphe, je ne saurais omettre de mentionner Brigitte Da Silva, Patrick Suchet, Agnès Vérin et Laurence Turpin qui par leur présence conviviale et leur efficacité permettent de résoudre une foule de petits problèmes au quotidien.

L'après-thèse se prépare pendant... A ce sujet, je dois exprimer une reconnais-

sance toute particulière à Laurent Bourdieu et Jean-François Léger, qui ont consacré énormément de temps à m'éclairer sur le domaines des neurosciences vers lequel j'ai décidé de m'aventurer. Merci aussi à Claire Wyart pour les conseils qu'elle m'a prodigués lors de nos discussions à Cargèse.

Une thèse étant une aventure scientifique et humaine il est naturel que ces remerciements s'achèvent sur une note moins professionnelle. Parce qu'ils m'ont permis de préserver un équilibre, ô combien nécessaire surtout dans les moments difficiles, je remercie du fond du cœur les autres tentacules du quatuor Octopus : Louise De Raymond, Amandine Mussou et Olivier Moulin, et ma famille, mes parents une nouvelle fois, ainsi que Marie-Perrine, Anne-Carole et Richard, pour leur soutien indéfectible, mais jamais invasif. En point d'orgue figure Sarah, qui est entrée dans ma vie au cours de ma thèse, et qui les a toutes deux fait décoller !

Table des matières

Introduction	3
I Actine et myosines à différentes échelles	5
A Les molécules et leurs propriétés élémentaires	6
1 - Actine	6
2 - Myosine II	10
B Propriétés mécaniques in vitro des myosines	16
1 - Expériences à l'échelle de la molécule unique	16
2 - Motilité de filaments d'actine in vitro	20
C Modèle du fonctionnement d'une myosine	25
1 - Modèle du coup de force	25
2 - Propriété de mécanosensibilité de la myosine	27
D Myosines dans des structures organisées	30
1 - Myosine II et contraction musculaire	30
2 - Myosine 1c et mécanosensibilité des cellules ciliées de l'oreille interne	41
3 - Oscillations spontanées du système acto-myosine	47
E Effets collectifs dans les systèmes de moteurs	52
1 - Indications d'effets collectifs dans les muscles	52
2 - Un exemple de propriété collective en biophysique	53
3 - Approches théoriques du comportement collectif de moteurs mo- léculaires	55
4 - Conclusion	61
II Techniques et méthodes expérimentales	63
A Instrumentation	63
1 - Pince optique	66
2 - Filtres et contraintes optiques diverses	76
3 - Système de détection	80
4 - Acquisition et génération de signaux	84
5 - Procédures de calibration et performances	88
6 - Améliorations	96
7 - Tableau récapitulatif	97
B Protocoles biochimiques	98
1 - Polymérisation de l'actine	98

2 Table des matières

2 - “Heavy-MeroMyosin (HMM)”	98
3 - Fonctionnalisation des billes	99
4 - Fixation des protéines sur les lamelles de verre	102
5 - Libération d’ATP cagé	104
6 - Cocktails enzymatiques annexes	105
7 - Déroulement typique d’une expérience	107
III Comportement collectif des myosines II	113
A Assemblée de moteurs s’opposant à une force élastique	113
1 - Principe des expériences	113
2 - Etude du mouvement spontané	115
B Relation force-vitesse d’une collection de moteurs	122
1 - Protocole	122
2 - Friction sur une bille en l’absence de moteurs	123
3 - Moteurs sans ATP	124
4 - Moteurs actifs	129
C Réponse de moteurs à des marches alternées	136
1 - Réponse de moteurs passifs	136
2 - Réponse de moteurs actifs	141
3 - Relation force-déplacement de moteurs actifs	147
D Discussion	149
1 - Oscillations mécaniques du système acto-myosine	149
2 - Réponse à des marches	155
3 - Améliorations et perspectives	157
E Un autre type de mouvement généré par les moteurs	158
1 - Observations expérimentales	158
2 - Interprétation	160
IV Expériences à l’échelle de la molécule unique	163
A Données brutes et mesure du pas des HMM	163
B Mesure de la raideur du lien actine-myosine	166
C Interprétation et discussion des résultats	169
1 - Validité de l’analyse des données	169
2 - Raideurs du lien actomyosine in vitro et dans les muscles	171
3 - Un rôle non-spectateur du filament d’actine	172
D Conclusion	174
Conclusion générale et perspectives	175
Annexes	177
Références bibliographiques	197
Notations et abréviations	207

Introduction

DU transport intracellulaire à la contraction musculaire, les fonctions nécessitant la production de travail mécanique par les organismes vivants, c'est-à-dire l'exercice d'une force couplé à la génération d'un déplacement, sont nombreuses et diverses. Au niveau moléculaire, elles impliquent très souvent l'action de protéines spécifiques, appelées de manière générique moteurs moléculaires. Ces moteurs moléculaires effectuent des cycles mécano-chimiques, au cours desquels l'énergie issue de l'hydrolyse d'un nucléotide est convertie en travail mécanique, *via* une interaction avec un microtubule ou un filament d'actine, deux des éléments constitutifs fondamentaux des cellules eucaryotes.

Objets biologiques dotés de propriétés mécaniques, les moteurs moléculaires sont par nature un sujet d'étude de prédilection en biophysique. Ces dernières décennies, un considérable effort de recherche a été fourni pour comprendre leur mécanisme de fonctionnement. Les développements technologiques aidant, il a été possible d'effectuer des mesures à l'échelle de la molécule unique, au cours desquelles l'activité d'un moteur individuel est observée en temps réel. On dispose à présent d'une connaissance très fine des étapes successives du cycle mécano-chimique individuel de différents moteurs, et en particulier celui du plus courant d'entre eux, la myosine II, qui, en interaction avec les filaments d'actine, est responsable entre autres fonctions de l'activité contractile des muscles.

Néanmoins il est rare, *in vivo*, que des moteurs opèrent individuellement, et ce fait n'est certainement pas anodin. Comme l'écrit Claudia Veigel¹ : "The various functions of cellular motility (...) are never based on motor proteins working in isolation. Mechanical interaction between motors, interactions with regulatory agents, in local complexes or in more extended networks, introduce a whole new layer of complexity that needs to be experimentally explored and also modelled".

L'objectif principal du travail exposé dans ce manuscrit est d'étudier, du point de vue expérimental, les propriétés nouvelles qui peuvent émerger lorsqu'on observe l'activité non plus d'une myosine II individuelle, mais d'un groupe de myosines II. L'approche *in vitro* que nous avons privilégiée permet de travailler dans des conditions physiques et chimiques contrôlées, et surtout de n'utiliser que les ingrédients minimaux nécessaires au développement d'une activité mécanique par les moteurs, par opposition aux systèmes physiologiques où interviennent de nombreux processus annexes de régulation.

¹Directrice du groupe "Etudes en molécule unique de moteurs moléculaires" au National Institute for Medical Research, Londres. (<http://www.nimr.mrc.ac.uk/physbiochem/veigel/background/>)

Le premier chapitre de cette thèse rappelle, de manière non exhaustive, différents aspects de l'interaction des myosines et des filaments d'actine, avec un intérêt particulier pour la myosine II, depuis l'échelle moléculaire jusqu'aux systèmes physiologiques organisés. Nous décrivons ensuite en détail le dispositif expérimental que nous avons construit, au laboratoire "Physico-Chimie Curie" de l'Institut Curie, afin de manipuler des microbilles servant d'intermédiaires pour sonder les propriétés mécaniques des systèmes de moteurs, mais aussi pour mesurer les forces et les déplacements qu'ils produisent, aux échelles respectivement du piconewton et du nanomètre. Nous présenterons ensuite les résultats des expériences que nous avons effectuées sur les mouvements générés par des groupes de myosine II interagissant avec un filament d'actine unique, ainsi que des mesures des propriétés dynamiques d'un tel système. Dans le dernier chapitre, nous mentionnerons enfin des expériences préliminaires à l'échelle de la molécule individuelle qui pourraient, si elles sont confirmées, ouvrir de nouvelles perspectives sur le rôle du filament d'actine dans la production de travail mécanique par les myosines.

Chapitre I

De la molécule unique à la fibre musculaire : actine et myosines à différentes échelles

LE cytosquelette, terme désignant l'ensemble des éléments du cytoplasme qui déterminent l'architecture de la cellule eucaryote, est constitué de trois types de filaments : l'actine, les microtubules, et une troisième famille moins étudiée regroupant les filaments intermédiaires. Mais il ne s'agit pas seulement d'une charpente : les filaments d'actine et les microtubules sont des structures extraordinairement dynamiques, capables de s'assembler et de se désassembler continuellement. En constante réorganisation, le cytosquelette permet à la cellule de se mouvoir, de croître, de sonder les propriétés mécaniques de son environnement. La motilité cellulaire, ainsi que d'autres formes d'activité mécanique dans la cellule comme la mitose, le transport intracellulaire de matière ou la mécanotransduction, s'appuient d'autre part sur des moteurs moléculaires qui utilisent le cytosquelette comme substrat. Ces moteurs sont capables de fournir un travail mécanique en consommant un "fuel moléculaire", des nucléotides contenant des liaisons chimiques fortes.

Dans ce manuscrit, nous nous intéressons à une famille particulière de moteurs moléculaires, désignés par le terme générique de myosines, qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) pour produire un travail mécanique en interagissant avec les filaments d'actine. Découvert initialement dans la contraction musculaire, ce mode de génération de force par des protéines motrices a été ensuite retrouvé dans une immense variété de configurations. La compréhension du fonctionnement des moteurs moléculaires jusqu'au niveau le plus fondamental a fait l'objet de très nombreux travaux depuis plusieurs décennies. La progression constante des techniques disponibles a déterminé le rythme des avancées conceptuelles : les premières études tentaient à partir de mesures sur des systèmes macroscopiques complexes, les fibres musculaires par exemple, de déduire certaines propriétés du mécanisme contractile de base. La démarche était bien entendue compliquée par la présence de nombreux éléments intermédiaires entre le système acto-myosine et les instruments de mesure. A partir des années 80, les expériences *in vitro* sur des protéines purifiées, puis les expériences à l'échelle de la molécule unique apparues au

début des années 90 ont permis d'éclaircir de plus en plus en détail les mécanismes moléculaires à l'œuvre dans le cycle biochimique et mécanique des moteurs.

Dans ce chapitre, en suivant le cheminement inverse, nous allons tenter de passer en revue l'état des connaissances, les différentes techniques expérimentales, et les modèles communément admis sur la dynamique des moteurs moléculaires. Nous rappellerons d'abord quelques notions de base sur la structure de l'actine et des myosines au niveau moléculaire, puis nous décrirons différents types d'expériences *in vitro* ainsi que le schéma de fonctionnement des myosines qui en a été déduit. Nous décrirons ensuite deux systèmes physiologiques, le muscle d'une part, et les cellules ciliées de l'oreille interne des vertébrés, d'autre part, dont les propriétés reposent, au moins en partie, sur l'activité d'ensembles de myosines. L'espoir de décrire complètement le comportement d'un organe complexe, mettant en jeu un grand nombre de moteurs, en élucidant complètement le mécanisme d'un moteur unique présuppose qu'au sein d'un groupe chaque moteur se comporte de manière indépendante des autres. Nous terminerons ce chapitre en décrivant quelques résultats indiquant que cela n'est peut-être pas toujours le cas.

A Les molécules et leurs propriétés élémentaires

1 Actine

1.1 Polymérisation

L'actine est l'une des protéines les plus abondantes des cellules eucaryotes : on estime qu'elle représente en moyenne 5 à 10 % de l'ensemble des protéines présentes dans une cellule, et jusqu'à 20 % dans les cellules musculaires. L'actine monomérique est une protéine globulaire (Actine G) asymétrique de 43 kDa contenant 375 acides aminés. En raison de sa tendance à s'assembler en filaments, sa structure n'a été obtenue qu'à partir de cristaux d'actine G complexée avec d'autres molécules pour empêcher la polymérisation. Plusieurs travaux, utilisant diverses molécules annexes, donnent des résultats similaires (Kabsch et coll., 1990; McLaughlin et coll., 1993; Schutt et coll., 1993). Le monomère d'actine est ainsi constitué de quatre sous-domaines et possède un site de fixation d'ATP ou d'ADP. Il peut aussi se lier à des ions calcium ou magnésium (Cooke, 1997).

L'actine G peut s'assembler spontanément pour former des filaments (Actine F). Les liaisons entre monomères étant essentiellement hydrophobes, la polymérisation est favorisée en solution par une augmentation de la teneur en sel, qui permet d'écranter les répulsions électrostatiques entre monomères, chargés négativement. Un filament se forme car les taux de polymérisation et de dépolymérisation sont différents à ses deux extrémités. L'extrémité la plus dynamique, caractérisée par les taux les plus élevés, est appelée "bout plus", ou bout barbé. Le "bout moins" est aussi appelé bout pointu. Au cours de la phase d'élongation d'un filament, les taux de croissance nets au bout barbé (dn_b/dt) et au bout pointu (dn_p/dt) sont donnés par la différence entre le taux de polymérisation $k_{on} \times C$, dépendant de la concentration

C en monomères libres, et de dépolymérisation k_{off} :

$$\frac{dn_b}{dt} = k_{\text{on},b}C - k_{\text{off},b} \quad (\text{I.1})$$

$$\frac{dn_p}{dt} = k_{\text{on},p}C - k_{\text{off},p}. \quad (\text{I.2})$$

A chaque extrémité, il existe une concentration critique ($C_C^+ = \frac{k_{\text{off},b}}{k_{\text{on},b}}$ et $C_C^- = \frac{k_{\text{off},p}}{k_{\text{on},p}}$ respectivement pour les bouts plus et moins) annulant le taux de croissance.

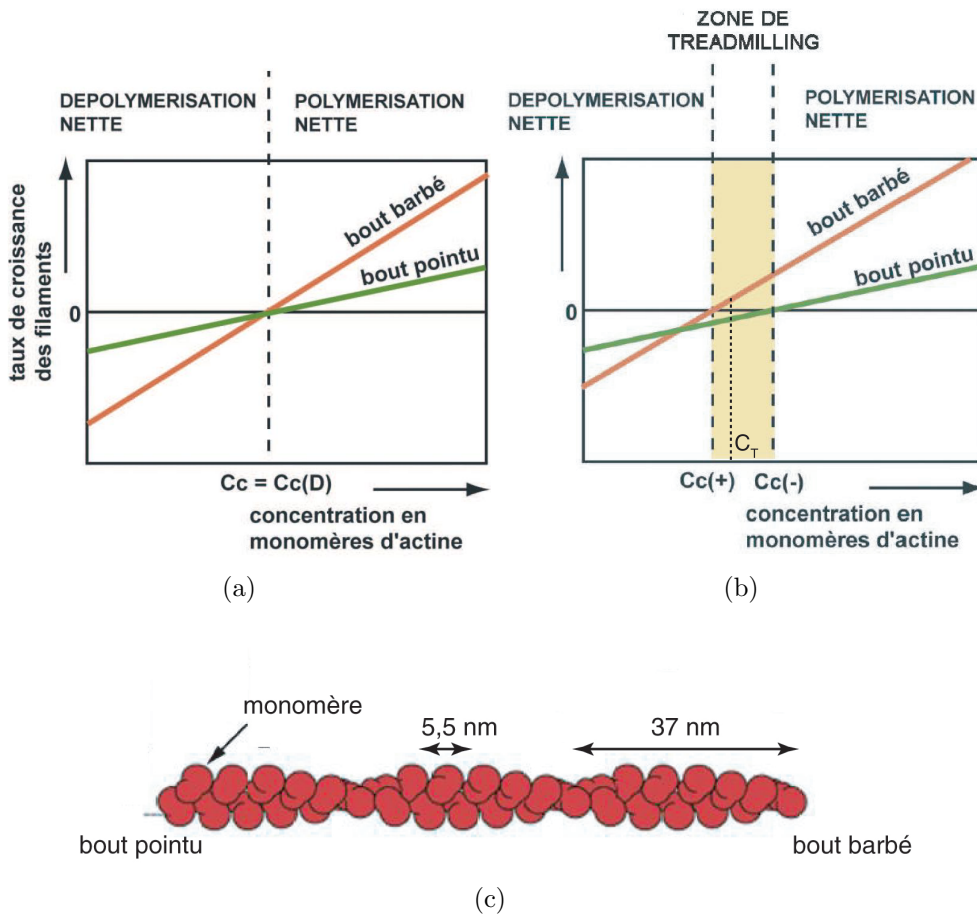


FIG. I.1: **Taux de croissance des filaments d'actine aux deux extrémités**
 (a) En l'absence d'ATP, les concentrations critiques aux deux bouts sont identiques et correspondent à un état d'équilibre
 (b) En présence d'ATP, les concentrations critiques sont différentes. On atteint un état stationnaire de "tapis roulant"
 Représentation schématique d'un filament d'actine.
 (a), (b) : adapté de (Bray, 2001). (c) Adapté de (Alberts et coll., 1994)

Avec des monomères uniquement sous forme ADP, $C_C^+ = C_C^-$ (Fig. I.1(a)). Si la concentration initiale en monomères est suffisamment importante, des filaments se

forment jusqu'à atteindre un état d'équilibre entre les formes globulaire et filamenteuse, lorsque la concentration de monomères libres atteint la concentration critique $C_c = k_{\text{off},b}/k_{\text{on},b} = k_{\text{off},p}/k_{\text{on},p}$, de l'ordre de $1 \mu\text{M}$.

Un filament a une structure en double hélice de pas égal à 37 nm constituée de deux protofilaments parallèles, au sein desquels les monomères d'actine ont une périodicité de $5,5 \text{ nm}$ (Fig. I.1(c)). Les protofilaments étant orientés dans le même sens, les deux extrémités ne sont pas équivalentes, et le filament d'actine est donc structurellement polaire.

En présence d'ATP, l'activité ATPasique de l'actine rompt l'équilibre : la concentration critique devient différente aux deux bouts, et on atteint un régime stationnaire où la longueur des filaments est constante mais où le filament se déplace en moyenne, les taux de croissance au bout barbé et de décroissance au bout pointu étant égaux en valeur absolue (Fig. I.1(b)). Ce régime, connu sous le nom de "tapis roulant"¹ est à l'origine de la production de force par l'actine, et du rôle du cytosquelette d'actine dans la motilité cellulaire. Tous ces mécanismes dynamiques sont régulés par une foule de protéines, dont l'étude détaillée constitue un champ de recherche à part entière qui n'est pas directement relié au travail dont traite ce manuscrit².

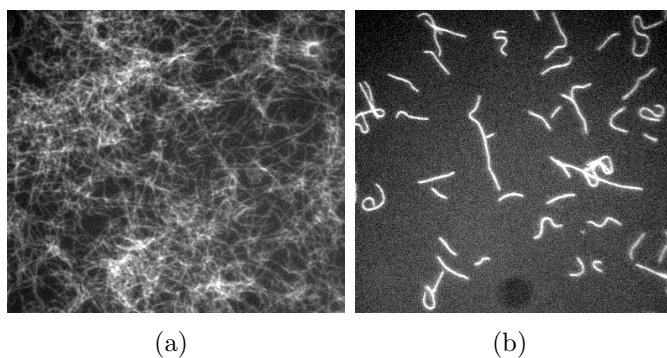


FIG. I.2: **Observation en microscopie d'épifluorescence de filaments d'actine en solution**

(a) Filaments d'actine, marqués à la phalloïdine fluorescente, à une concentration supérieure à la concentration critique. Ils forment un réseau très dense et enchevêtré.

(b) Filaments d'actine en faible concentration, collés sur une surface de verre. Outre son rôle de marqueur fluorescent, la phalloïdine est dans ce cas indispensable pour empêcher la dépolymérisation rapide des filaments.

A l'équilibre, c'est-à-dire sans ATP, et à la concentration critique, les filaments d'actine forment un réseau très enchevêtré, très peu adapté à l'observation et à la manipulation de filaments d'actine individuels (Fig. I.2(a)). Une simple dilution entraîne la dépolymérisation rapide des filaments. La solution universellement adoptée consiste à stabiliser la forme filamenteuse de l'actine en utilisant de la phalloïdine,

¹"treadmilling"

²Pour plus de détails, on peut par exemple consulter (Plastino et Sykes, 2005; Blanchoin et coll., 2000)

toxine purifiée à partir de l'amanite phalloïde qui se fixe uniquement sur l'actine F. On bloque ainsi complètement la dynamique de l'actine, et on peut garder des filaments même à très basse concentration. Par ailleurs, un filament d'actine a un diamètre d'environ 7 nm, ce qui est bien inférieur à la résolution de tous les microscopes optiques. Lorsqu'on utilise de la phalloïdine liée à un marqueur fluorescent pour stabiliser l'actine F, les filaments deviennent observables en microscopie de fluorescence standard, ce qui facilite évidemment leur manipulation (Fig. I.2(b)).

1.2 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques d'un filament d'actine individuel ont été mesurées directement *in vitro*. Pour les raisons expliquées ci-dessus, les mesures mécaniques sur des filaments individuels s'effectuent avec des filaments décorés par la phalloïdine. Celle-ci peut modifier les propriétés mécaniques de l'actine par rapport à un filament nu. En particulier, des mesures de fluctuations de courbure de filaments en solution ont montré que la longueur de persistance l_p , et le module de courbure (rigidité de courbure $\kappa = k_B T l_p$), qui lui est proportionnel, sont deux fois plus faibles en l'absence de phalloïdine (Isambert et coll., 1995, $l_p = 9 \mu\text{m}$ et $18 \mu\text{m}$ respectivement). Dans le tableau I.1, nous regroupons différentes grandeurs mécaniques utiles du filament d'actine, toutes mesurées sur des filaments stabilisés à la phalloïdine.

Propriété	Valeur	Module d'Young estimé	Référence
Rigidité longitudinale (k)	$44 \pm 5 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$	1,8 GPa	(Kojima et coll., 1994) (Filaments de $1 \mu\text{m}$)
Rigidité de torsion	$80 \pm 12 \text{ nN} \cdot \text{nm}^2$	2,5 GPa	(Tsuda et coll., 1996)
	$28 \pm 3 \text{ nN} \cdot \text{nm}^2$	1,5 GPa	(Yasuda et coll., 1996)
Rigidité de courbure (κ)	$73 \pm 4 \text{ nN} \cdot \text{nm}^2$	2,6 GPa	(Gittes et coll., 1993)
	$60 \pm 2 \text{ nN} \cdot \text{nm}^2$		(Yasuda et coll., 1996)

TAB. I.1: Valeur des différents modules élastiques de l'actine

Les modules d'Young estimés à l'aide des différents modules élastiques reposent sur l'hypothèse que le filament d'actine se comporte comme un barreau rigide. Ainsi, par exemple, pour un filament de section S et de longueur L , le module d'Young E et la rigidité longitudinale k sont liés par

$$E = \frac{kL}{S}. \quad (\text{I.3})$$

Cette hypothèse est vraisemblable dans ces expériences, où le filament est soumis à des tensions très importantes ($\gtrsim 200 \text{ pN}$, (Kojima et coll., 1994)) de l'ordre des tensions que subissent les filaments d'actine présents dans les fibres musculaires. Lorsque les tensions sont plus faibles, l'actine se comporte comme un filament semi-flexible et les fluctuations thermiques jouent un rôle important. La rigidité longitudinale d'un polymère semi-flexible de longueur L_0 , caractérisé par une rigidité

de courbure κ soumis à une tension σ à la température T vaut

$$k = \frac{4\sqrt{\kappa}}{k_B T L_0} \sigma^{3/2}, \quad (\text{I.4})$$

k_B désignant la constante de Boltzmann (la démonstration figure en annexe p. 194). Cette raideur est non linéaire, dépend de la tension appliquée au polymère, et de la température ce qui traduit son origine entropique.

En prenant $\kappa = 6 \cdot 10^{26} \text{ N} \cdot \text{m}^2$, $T = 300 \text{ K}$, un filament d'actine de $5 \mu\text{m}$ de long, soumis à une tension de 5 pN a une raideur longitudinale $k = 0,5 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. L'application de la formule du barreau rigide pour une même longueur donne $k = 8,8 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Un filament d'actine soumis à de faibles tensions est donc beaucoup plus souple que ce que les mesures *in vitro* effectuées à haute tension peuvent laisser supposer ! En revanche, lorsque $\sigma = 200 \text{ pN}$ et $L_0 = 1 \mu\text{m}$, la formule de la rigidité entropique donne $k = 670 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, ce qui est bien supérieur aux valeurs mesurées. Dans cette gamme de tension, il paraît légitime de considérer l'actine comme un barreau rigide. La valeur de $44 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ correspond alors à la "vraie" élasticité mécanique du filament.³

Outre ses nombreuses fonctions dynamiques et structurales, l'actine catalyse l'activité enzymatique, de l'une des grandes familles de moteurs moléculaires, les myosines.

2 Myosine II

Les myosines utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour produire un travail mécanique, en interagissant avec un filament d'actine. Toutes les myosines présentent au moins 50 % d'homologie de séquence au niveau de leur domaine moteur. En revanche la partie non motrice de la protéine varie énormément d'une variété de myosine à l'autre. A ce jour, près de 150 myosines différentes ont été répertoriées, réparties en 18 familles.

Nous allons dans ce qui suit décrire la structure et le fonctionnement de la myosine II, la plus répandue et la plus étudiée de toutes les familles de myosines.

2.1 Fonctions

La myosine II, également appelée pour des raisons historiques "myosine conventionnelle", est la première myosine découverte. La myosine II existe, sous différentes isoformes, dans tous les types de muscles –muscles squelettiques, muscles lisses, muscles cardiaques– où elle représente de 40 à 50% de l'ensemble des protéines. Elle est responsable des propriétés contractiles des fibres musculaires (Alberts et coll., 1994). La myosine II est également présente dans presque toutes les cellules non

³Une autre possibilité serait que la raideur mesurée soit celle des liens entre l'actine et les appareils de mesure, mais le fait que la valeur de raideur mesurée soit différente avec et sans protéines régulatrices de l'actine (Kojima et coll., 1994) suggère que la grandeur mesurée est bien caractéristique du filament.

musculaires ; elle intervient dans toute une série de phénomènes nécessitant la génération de force (dynamique du cortex cellulaire (Bray et White, 1988; Salbreux et coll., 2007), adhésion (Cai et coll., 2006), motilité (Jay et coll., 1995)...). Récemment, il a été proposé que la myosine II, à concentration élevée, soit un agent de dépolymérisation active des filaments d'actine (Haviv et coll., 2008).

2.2 La myosine II entière et ses sous-fragments

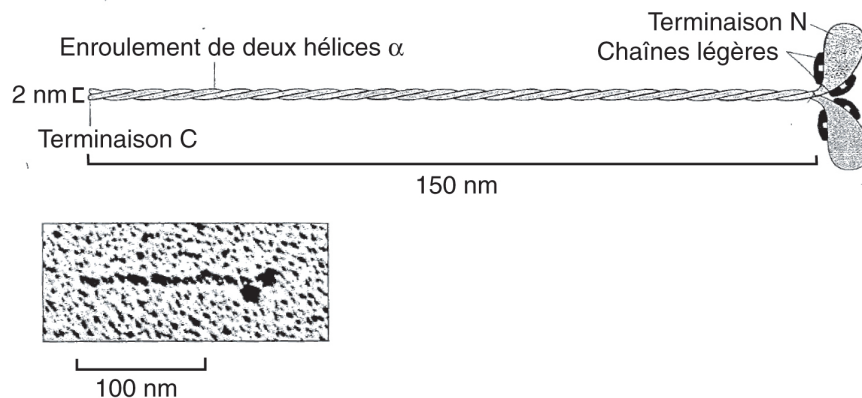


FIG. I.3: **Structure générale de la myosine II**

Cliché de microscopie électronique de la myosine II entière et schéma interprétatif. Les deux chaînes lourdes forment les têtes et s'enroulent au-delà du point de jonction pour former la queue. Chaque tête est décorée de deux chaînes légères. D'après (Alberts et coll., 1994).

La myosine II entière est une grosse protéine de poids moléculaire 500 kDa environ. Elle est constituée de deux chaînes lourdes, d'environ 2000 acides aminés chacune, et de deux types de chaînes légères, chaque type étant représenté à deux exemplaires dans la molécule, d'un peu moins de 200 acides aminés. Comme l'indiquent les images de microscopie électronique en basse résolution, la molécule est composée de deux têtes globulaires et d'une longue queue d'environ 150 nm de long et 2 nm de large (Fig. I.3). La myosine II est soluble en solution à haute concentration en sel (supérieure à 0,5 M). Dans les conditions physiologiques usuelles, la teneur en sel est plus faible. Les myosines II sont alors insolubles et s'assemblent spontanément par la queue en filaments bipolaires. Ce processus dépend de l'état de phosphorylation de l'une des deux chaînes légères. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, la queue est repliée sur la tête et la myosine est inactive. La phosphorylation déplie la queue, ce qui à la fois active la myosine et permet l'auto-assemblage en filaments (Fig. I.4). La phosphorylation est catalysée *in vivo* par une enzyme ("myosin light chain kinase"), elle-même régulée par le calcium. C'est par ce biais qu'une augmentation de la concentration cytosolique de calcium provoque l'activation des myosines dans les muscles lisses, et la formation transitoire de filaments de myosine II dans les cellules non musculaires (Alberts et coll., 1994).

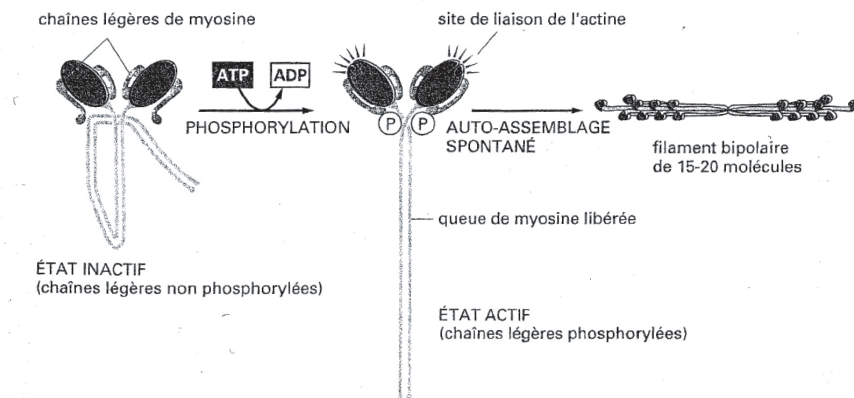


FIG. I.4: **Phosphorylation de la myosine II et formation de filaments**

La phosphorylation de l'un des deux types de chaîne légère est nécessaire à l'activation de la myosine et à la formation spontanée de filaments bipolaires. Issu de (Alberts et coll., 1994).

Un traitement *in vitro* par la trypsine, une enzyme protéolytique, coupe la myosine au milieu de la queue en deux sous fragments : la "Heavy Mero-Myosin (HMM)" (poids moléculaire 350 kDa) et la "Light Mero-Myosin (LMM)" (150 kDa) (Fig. I.5). La HMM contient les deux têtes et la première partie de la queue. La LMM est

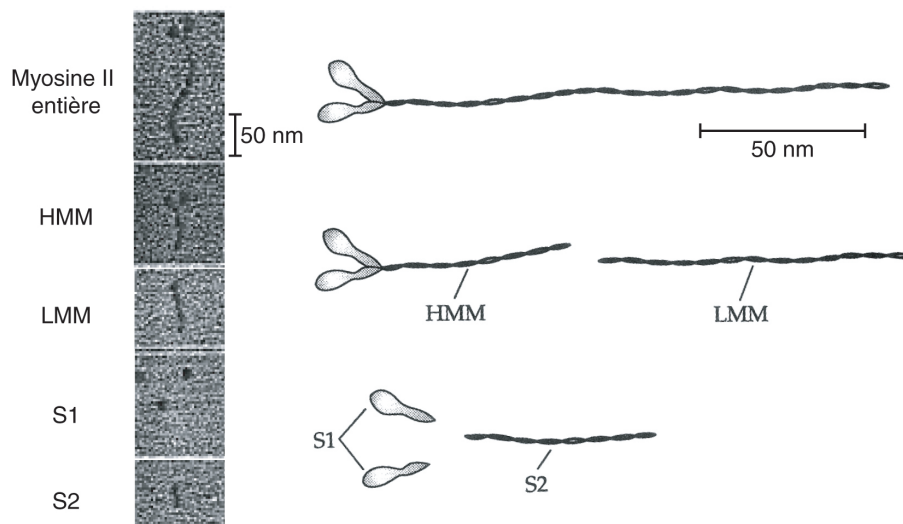


FIG. I.5: **Fragments protéolytiques de la myosine II**

Clichés de microscopie électronique des produits de la digestion de la myosine II par la trypsine et la papaïne (issus de (Lowey et coll., 1969)) et représentation schématique des points de fragmentation (issus de (Howard, 2001)).

constituée de l'autre partie de la queue. Comme la myosine entière, les LMM ne sont solubles qu'en haut sel, et s'assemblent en filaments dans le cas contraire. Elles

ne montrent pas d'activité ATPasique. Les HMM sont solubles à toutes concentrations en sel, peuvent se lier à l'actine et ont une activité ATPasique semblable à celle de la myosine entière. La HMM peut être également séparée par une autre enzyme, la papaïne, en deux types de sous-fragments S1 et S2 (Lowey et coll., 1969; Margosian et Lowey, 1982). Les fragments S1 sont constitués uniquement des têtes isolées de la myosine entière, et sont capables d'hydrolyser l'ATP et de se lier à l'actine. Les têtes de la myosine contiennent donc le site d'accrochage à l'actine et le site de fixation des nucléotides.

2.3 Structure détaillée de la tête

La structure de la tête S1 de la myosine II a été déterminée avec une haute résolution (Fig. I.6) (Cooke, 1997). Elle est constituée du domaine catalytique de la

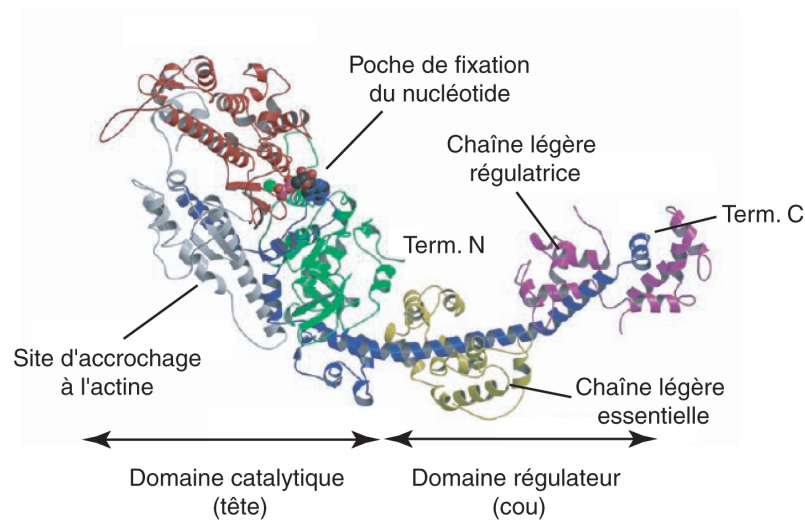


FIG. I.6: **Modèle de la structure du fragment S1 de la myosine II**
Adapté de (Geeves et Holmes, 1999)

protéine, comprenant les sites d'accrochage de l'actine et des nucléotides, et d'une région plus fine, le domaine régulateur (le "cou" de la myosine), qui s'étend du domaine catalytique jusqu'à la jonction avec la queue. Le domaine catalytique est entièrement composé de la chaîne lourde de la myosine. Cette chaîne lourde se termine en une unique hélice α , longue de 8,5 nm, qui joint le domaine catalytique à la queue. Cette hélice α (en bleu sur la fig. I.6) est l'élément central du cou ; elle est stabilisée par deux chaînes légères, la première, la chaîne légère essentielle, près du domaine catalytique et la deuxième, la chaîne légère régulatrice, près de la jonction avec la queue. Les deux chaînes s'enroulent autour de l'hélice.

Cette organisation en un domaine catalytique prolongé par un cou plus fin décoré de chaînes régulatrices n'est pas spécifique à la myosine II. Comme nous l'avons mentionné plus haut, les myosines sont caractérisées par d'importantes similarités

de la structure du domaine moteur. L'organisation générale de la tête est la même pour toutes les myosines.

2.4 Activité enzymatique

En l'absence d'actine, la myosine II a un taux d'hydrolyse de l'ATP assez faible : environ $0,1 \text{ s}^{-1}$. Les étapes de la réaction sont les suivantes : la myosine se lie à une molécule d'ATP, l'hydrolyse en ADP et P_i , et libère ensuite séquentiellement le phosphate puis l'ADP. L'étape limitante de la réaction est le relargage du phosphate. L'actine catalyse l'hydrolyse de l'ATP par la myosine : en présence d'actine, le taux d'hydrolyse est de 25 s^{-1} . L'actine accélère donc de deux ordres de grandeur l'étape de détachement du phosphate. Par ailleurs, en l'absence d'ATP, la myosine se lie fortement à l'actine, dans un état appelé *rigor mortis*, avec un taux de décrochage faible (environ 1 s^{-1} ; toutes les données de ce paragraphe sont issues de (Howard, 2001)). L'ATP augmente ce taux d'un facteur 1000, ce qui signifie que la fixation d'une molécule d'ATP catalyse la dissociation de l'actine et de la myosine.

2.5 Couplage mécano-chimique

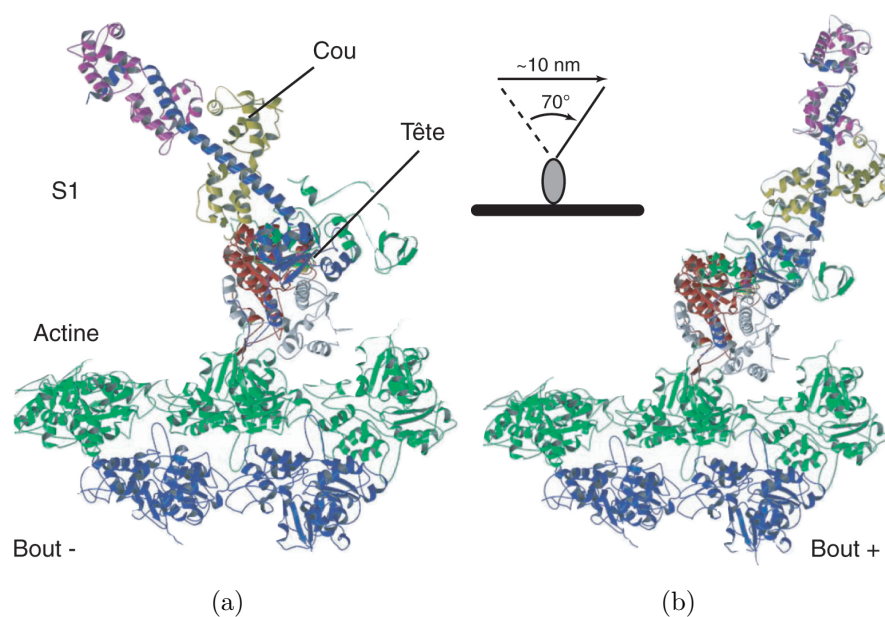


FIG. I.7: Modèles de structure d'un fragment S1 de myosine II se muscle squelettique liée à l'actine et à deux nucléotides différents

(a) S1 avec un complexe ADP-vanadate, analogue de l'ADP- P_i .

(b) S1 avec un complexe ADP- BeF_3 , mimant la structure obtenue avec de l'ADP. Entre les deux états, le cou effectue une rotation de 70° , comme illustré sur le schéma, correspondant à un déplacement de son extrémité d'environ 10 nm. Adapté de (Geeves et Holmes, 1999)

Le couplage mécano-chimique repose sur le fait que des modifications de l'état biochimique de la myosine, correspondant aux différentes étapes de l'hydrolyse de

l'ATP, sont associées à un changement conformationnel du complexe acto-myosine. La figure I.7 montre le modèle de structure d'un sous-fragment S1 de myosine II de muscle squelettique interagissant avec l'actine, avec deux nucléotides différents. Entre l'état ADP-P_i et l'état ADP, l'orientation du domaine catalytique est très peu modifiée. En revanche, le cou pivote d'un angle de 70°. Le déplacement correspondant de l'extrémité du cou, vers le bout barbé de l'actine, vaut environ 10 nm.

La libération d'ADP conduisant à l'état *rigor* sans nucléotide peut également être associée à une rotation supplémentaire du cou de la myosine. Dans le cas du fragment S1 d'une myosine de muscle lisse, cette rotation est d'environ 20° (Gollub et coll., 1996; Whittaker et coll., 1995). Par ailleurs, il a été observé que la cinétique de décrochage d'une myosine-ADP liée à l'actine est dépendante de la force appliquée au moteur, et que le temps de vie de la myosine-ADP liée à l'actine soumise à une force est plus long qu'en l'absence de nucléotide (Guo et Guilford, 2006). Cela indique qu'une force appliquée au moteur modifie le paysage énergétique des états lié à l'ADP et sans nucléotide, ce qui suggère que la libération d'ADP s'accompagne d'un changement conformationnel de la molécule (*cf infra* p. 27).

Il est possible de produire par génie génétique des myosines II avec des domaines régulateurs plus ou moins longs. Le déplacement produit par ces moteurs, mesuré en expérience de molécule unique (*cf infra* p. 16), est proportionnel à la longueur du cou (Fig. I.8). Celui-ci joue donc un rôle de bras de levier, destiné à amplifier les déplacements très faibles induits par des changements conformationnels dans le domaine catalytique, associés à l'accrochage ou à la libération de nucléotides.

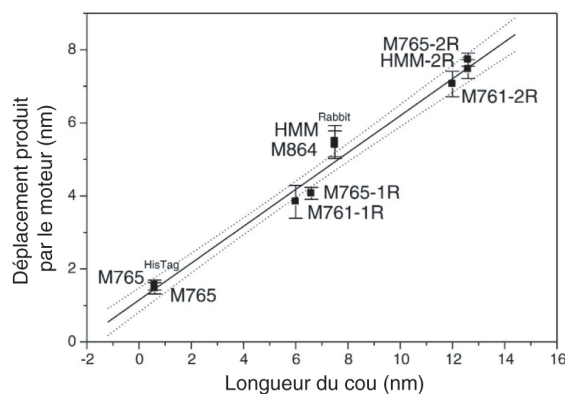


FIG. I.8: **Le domaine régulateur comme bras de levier**

Le déplacement produit par un moteur est proportionnel à la longueur de son cou, ce qui suggère que ce dernier joue un rôle de bras de levier. Adapté de (Ruff et coll., 2001)

B Propriétés mécaniques *in vitro* des myosines

Dans cette partie, nous décrivons les principales expériences *in vitro* donnant accès aux propriétés mécaniques des moteurs moléculaires. Il s'agit à la fois de décrire les techniques utilisées et les résultats essentiels qui en ont été déduits.

1 Expériences à l'échelle de la molécule unique

1.1 Déplacements et forces élémentaires

L'avènement des expériences à l'échelle de la molécule unique, permettant de mesurer directement l'interaction d'une seule molécule de myosine avec un filament d'actine, a permis de grandes avancées dans la compréhension du mécanisme de fonctionnement d'un moteur moléculaire.

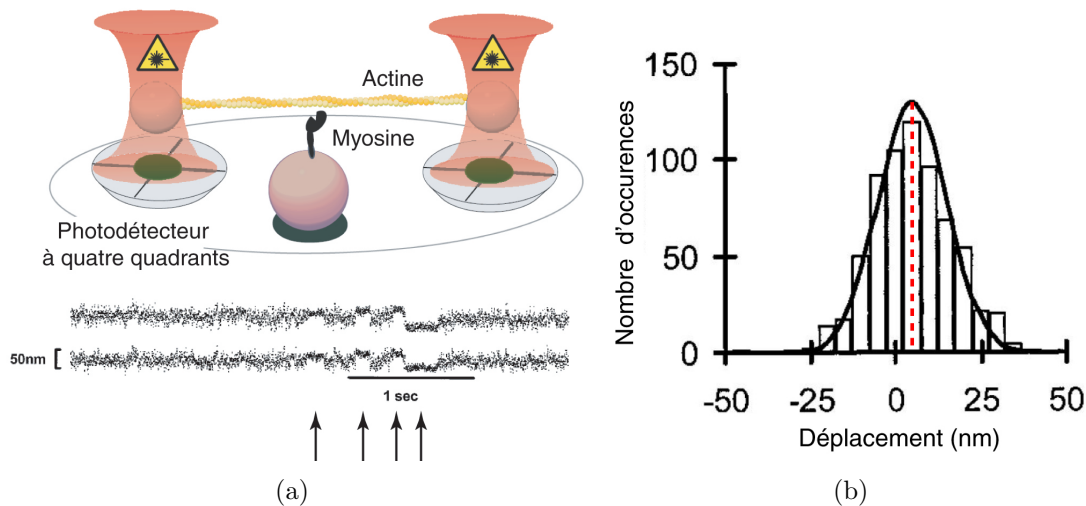


FIG. 1.9: **Mesure mécanique sur une myosine II individuelle**

(a) Ces expériences utilisent une géométrie à trois billes : deux billes maintenues par deux pièges optiques permettent d'approcher un filament d'actine à proximité d'une myosine. La position des billes est mesurée avec une résolution nanométrique par des photodiodes. Les séquences de réduction de l'amplitude des fluctuations (indiquées par des flèches) indiquent l'accrochage du moteur. Schéma adapté de (Batters et coll., 2004b), signaux extraits de (Veigel et coll., 1998).

(b) Distribution des déplacements induits par une HMM. La fonction gaussienne donnant le meilleur ajustement à l'histogramme des valeurs mesurées a une largeur correspondant à l'amplitude des fluctuations browniennes des billes. Le décalage de la valeur centrale de la gaussienne par rapport à 0, qui vaut 5 nm, fournit le déplacement moyen produit par un moteur. Adapté de (Veigel et coll., 1998)

Dans une géométrie "à trois billes" (Finer et coll., 1994), utilisée pour l'étude des myosines I et II, un filament d'actine est tendu entre deux billes tenues par deux pinces optiques, ce qui permet de le maintenir au voisinage d'une troisième bille sur laquelle est fixé un moteur, dans une solution contenant de l'ATP (Fig. 1.9(a)). Une description détaillée d'un dispositif permettant d'effectuer des expériences de ce

genre est donnée au chapitre II. Une pince optique s'obtient en focalisant fortement un faisceau laser pour générer un gradient d'intensité électromagnétique suffisamment fort pour piéger des objets diélectriques, par exemple des microbilles en latex. Outre la manipulation des billes piégées, un autre intérêt majeur de ce genre de système est qu'il permet de mesurer des forces qui agissent sur ces billes (Neuman et Block, 2004).

Les traces temporelles de la position des billes montrent le mouvement brownien de l'ensemble bille-actine-bille, interrompu de manière stochastique par des séquences où les fluctuations sont fortement réduites, trahissant l'accrochage du moteur (indiquées par des flèches sur la figure I.9(a)). La durée moyenne des événements d'accrochage dépend de la concentration d'ATP en solution selon une cinétique du premier ordre (Veigel et coll., 1998), ce qui est cohérent avec l'idée que la fixation d'ATP sur la myosine favorise son détachement de l'actine. Pour rendre les accrochages plus facilement détectables, les expériences en molécule unique sont en général effectuées à très faible concentration d'ATP (de l'ordre de quelques micromolaires).

Un événement d'accrochage s'accompagne d'un décalage de la position moyenne de la bille par rapport à la ligne de base. Mais la mesure du déplacement induit par le moteur est bruitée par les fluctuations du système (Molloy et coll., 1995a). Les décalages mesurés pour un ensemble d'événements sont d'amplitude et de direction variables; leur distribution suit une loi gaussienne, dont la largeur est déterminée par l'amplitude du mouvement brownien des billes piégées. Le décalage du centre de la gaussienne par rapport à l'origine fournit une mesure du déplacement moyen produit par la myosine (Fig. I.9(b)). Une molécule de HMM produit un déplacement de 5 nm environ (Veigel et coll., 1998)⁴. La valeur de la force moyenne produite par une myosine individuelle ne fait pas l'objet d'un consensus. En mesurant la force à appliquer pour empêcher la myosine de produire un déplacement, la force moyenne produite par une myosine II pendant un accrochage a été évaluée à 3 – 4 pN (Finer et coll., 1994). D'autres études rapportent des valeurs plus faibles (2,1 pN (Ishijima et coll., 1996), 1,7 pN (Molloy et coll., 1995a)), ou supérieures (9 pN (Takagi et coll., 2006)).

La mesure simultanée de force et de déplacement permet d'estimer la raideur du pont formé par l'accrochage d'une myosine à l'actine. Différentes méthodes donnent des valeurs de raideur s'échelonnant entre 0,2 et 1,2 pN · nm⁻¹ (Veigel et coll., 1998; Mehta et coll., 1997; Ishijima et coll., 1996; Takagi et coll., 2006; Nishizaka et coll., 2000). Nous reviendrons en détail sur ce point au chapitre IV. Remarquons que les raideurs obtenues à partir des mesures en molécule unique conduisent à des valeurs 2 à 10 fois plus faibles que celles qui résultent de mesures, indirectes, sur les fibres musculaires (*cf infra* p. 37).

⁴Dans l'article original (Finer et coll., 1994) le déplacement induit par une HMM est surestimé, à 11 nm, car les événements d'accrochage sont détectés uniquement lorsqu'ils induisent un déplacement supérieur à l'amplitude des fluctuations browniennes. Ce procédé élimine artificiellement une partie des accrochages générant des déplacements trop faibles pour sortir du bruit. En détectant les accrochages par la diminution de la variance du signal qu'ils induisent, un déplacement de 4 nm a ensuite été mesuré sur des fragments S1 (Molloy et coll., 1995a)

1.2 La production de force s'effectue en deux étapes

L'utilisation de myosines aux cinétiques plus lentes que la myosine II, comme la myosine 1, a permis d'accéder à des détails du changement conformationnel associé à l'activité de la myosine. En moyennant un grand nombre d'événements d'accrochage synchronisés soit à l'accrochage soit au décrochage de la myosine à l'actine, il a été montré que l'interaction avec l'actine s'effectue en deux étapes (Fig. I.10(a)) (Veigel et coll., 1999). La durée de la deuxième étape est dépendante de la concentration d'ATP en solution selon une cinétique du premier ordre, ce qui suggère qu'elle se termine par la fixation d'une molécule d'ATP à la myosine. La première étape est, elle, indépendante de la concentration en ATP (Fig. I.10(b)). Des observations similaires ont été effectuées sur la myosine 1c (Batters et coll., 2004a), la myosine II du muscle lisse (Veigel et coll., 2005) et récemment sur la myosine II du muscle squelettique (Capitanio et coll., 2006)⁵. Ces résultats indiquent que le déplacement produit par un moteur est le fruit de deux changements conformationnels successifs de la myosine au cours de son interaction avec l'actine. Le premier se produit presque simultanément à l'accrochage à l'actine. Le deuxième correspond à la transition entre deux états distincts fortement liés à l'actine. La liaison d'un ATP au moteur provoque ensuite son détachement du filament.

Il est possible, dans une expérience de molécule unique, d'appliquer une force au moteur lorsqu'il s'accroche à l'actine afin d'étudier l'influence d'une charge sur la cinétique des différentes étapes (Veigel et coll., 2003). La durée de l'étape 2 dépend faiblement de la charge appliquée, alors que celle-ci a un effet dramatique sur la durée de l'étape 1. Le taux de transition entre les deux états dépend exponentiellement de la charge, ce qui peut s'interpréter par l'existence d'une barrière énergétique entre les deux états dont la hauteur dépend de la force appliquée I.10(c). De manière analogue, il a été observé sur une myosine 1 que la durée moyenne des accrochages diminue lorsqu'une charge dans le sens du mouvement du moteur est appliquée, et augmente dans le cas contraire (Batters et coll., 2004b).

1.3 Accrochages non productifs

Il a été montré dans le cas d'une myosine "lente", la myosine 1c, que 80% des accrochages de la myosine à l'actine sont improductifs, c'est-à-dire ne produisent pas de force ni de déplacement (Batters et coll., 2004a; Batters et coll., 2004b). Ces événements ont une durée de vie inférieure ou égale à 100 ms, indépendante de la concentration en ATP et un ordre de grandeur plus courte que les événements productifs qui, eux, peuvent durer plusieurs secondes à 20 μM d'ATP. Il pourrait s'agir d'accrochages transitoires à l'actine, selon un processus réversible ne donnant pas lieu à la production de force. La myosine se détacherait rapidement sans poursuivre son cycle d'hydrolyse de l'ATP.

Notons que l'existence d'interactions actine-myosine II ne participant pas à la production de force, a également été mise en évidence dans les fibres musculaires.

⁵La cinétique rapide de cette myosine avait jusqu'alors masqué cette propriété, en raison d'une trop faible résolution temporelle de la détection des accrochages (Veigel et coll., 1999)

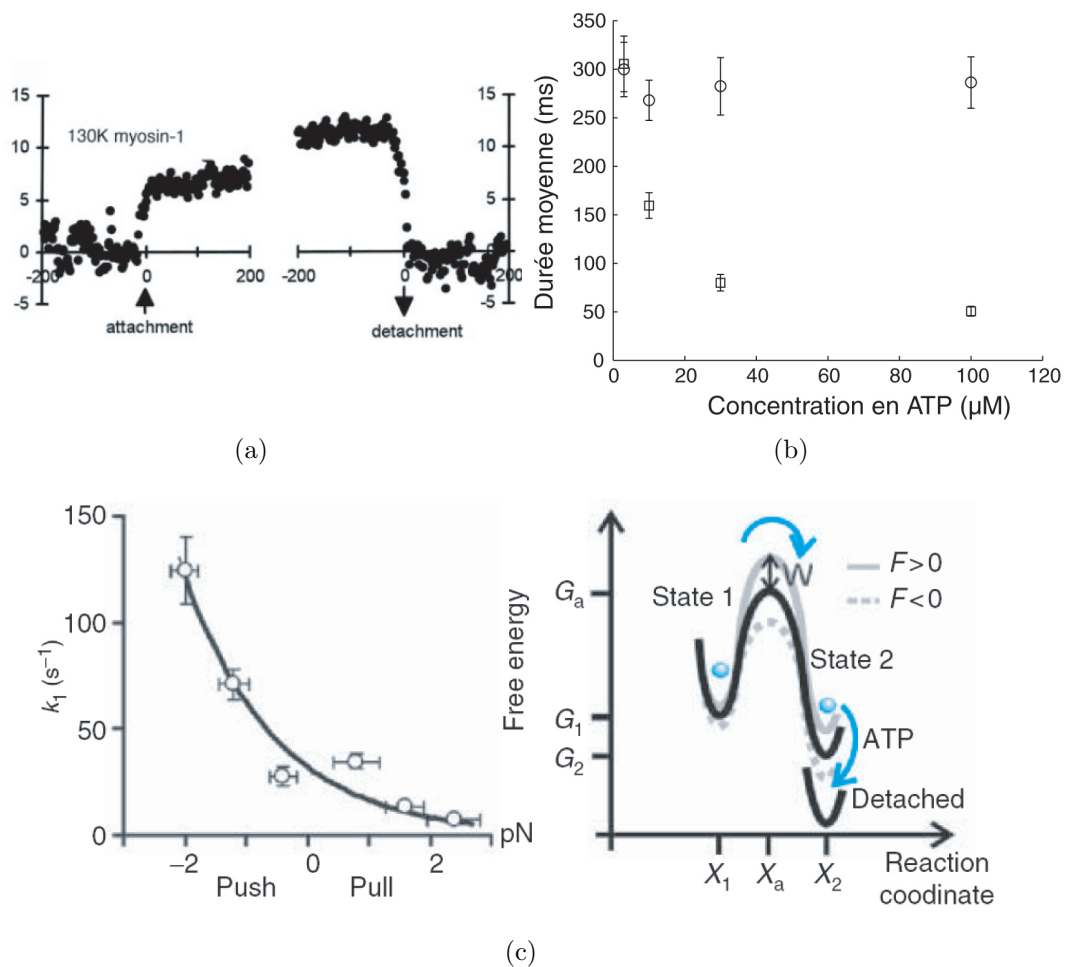


FIG. I.10: Le changement conformationnel de la myosine peut s'effectuer en deux étapes

(a) Moyenne d'ensemble de 63 accrochages de la myosine 1b synchronisés aux instants soit initial soit final. La première étape correspond en moyenne à un déplacement de 6 nm produit très rapidement après le début de l'interaction avec l'actine. Le déplacement moyen à la fin de l'accrochage est supérieur de 5,5 nm au déplacement initial; ce déplacement supplémentaire est dû à un deuxième changement conformationnel. Extrait de (Veigel et coll., 1999)

(b) La durée de la première étape (cercles) est indépendante de la concentration en ATP. En revanche, celle de la deuxième étape (carrés) décroît lorsque la concentration en ATP augmente, selon une cinétique du premier ordre. Graphe tracé à partir des données de (Veigel et coll., 1999).

(c) Effet d'une force extérieure sur le mécanisme de la myosine II des muscles lisses. A gauche : le taux de transition entre les deux états successifs dépend exponentiellement de la force (Push=dans le sens du mouvement de la myosine; Pull=dans le sens opposé). A droite : profil énergétique de la myosine au cours de l'accrochage à l'actine. La barrière énergétique en l'absence de force (en noir), peut être abaissée (pointillés gris) ou relevée (ligne grise pleine) selon le signe de la force extérieure. Extrait de (Veigel et coll., 2003)

Lorsqu'une fibre relaxée, c'est-à-dire dans des conditions biochimiques où elle ne produit pas de force contractile, est soumise à un étirement rapide, elle montre une raideur apparente importante, ce qui indique l'existence de myosines attachées à l'actine (Fig. I.11) (Brenner et coll., 1982).⁶ Comme cette raideur dépend de la

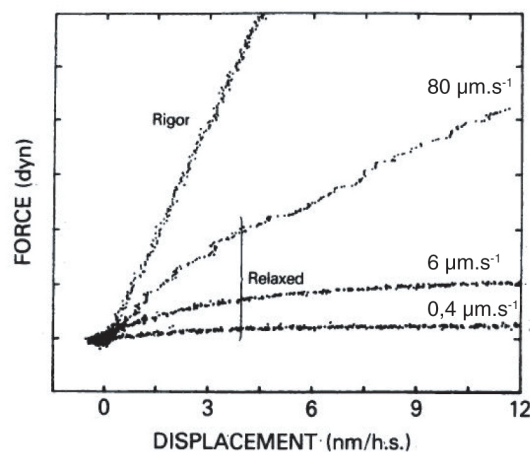


FIG. I.11: **Existence d'états accrochés non productifs**

Lorsqu'on étire très rapidement ($80 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) une fibre musculaire, la force augmente linéairement avec l'extension, trahissant une raideur importante de la fibre. Cette raideur apparente diminue quand la vitesse décroît ($6 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) et disparaît à faible vitesse ($0,4 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) Adapté de (Brenner et coll., 1982)

vitesse de l'étirement, cette observation suggère qu'un stimulus rapide est capable de déformer les myosines attachées à l'actine, donnant un comportement de ressort rigide, mais que celles-ci ont le temps de se détacher dans le cas d'un stimulus plus lent, si bien qu'on n'observe pas d'augmentation de force avec l'étirement.

2 Motilité de filaments d'actine *in vitro*

2.1 Principe

Lorsque des filaments d'actine fluorescents, dans une solution contenant de l'ATP, sont mis en présence d'une surface couverte de myosine, ils se déplacent le long de cette surface avec un mouvement continu et directionnel (Fig. I.12)(Kron et Spudich, 1986). Ce type de test de motilité *in vitro*, réalisé uniquement avec des protéines purifiées et des ingrédients minimaux dans des conditions facilement contrôlables, a permis d'importants progrès dans l'étude directe des mécanismes d'interaction

⁶Une fibre musculaire contient des éléments purement élastiques passifs, en parallèle du système contractile impliquant des myosines II (*cf infra* p. 30). La raideur de ces éléments passifs détermine la raideur minimale d'une fibre lorsque tous les moteurs sont décrochés. A l'opposé, la fibre a une raideur maximale à l'état *rigor*, lorsque toutes les myosines sont accrochées à l'actine. Entre ces deux états extrêmes, la mesure de la raideur d'une fibre musculaire permet donc de déterminer s'il existe des myosines accrochées.

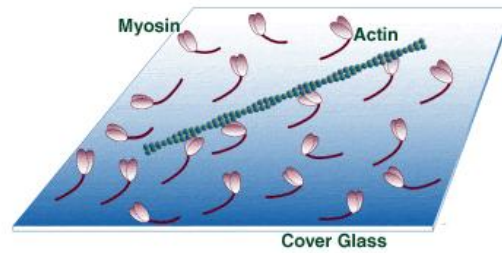


FIG. I.12: **Illustration d'une expérience de motilité in vitro**

L'action d'un tapis de myosines sur des filaments d'actine produit un mouvement dirigé de ces derniers le long de la surface.

Source : <http://physiology.med.uvm.edu/warshaw/TechspgInVitro.html>

actine-myosine et des facteurs l'influencent. Il a été adapté avec succès à tous les types de myosines, mais également aux moteurs associés aux microtubules, les kinésines et les dynéines. Une description détaillée du protocole est donnée dans (Kron et coll., 1991).

Dans l'étude originale de Kron et Spudich, des filaments de myosines II entières sont simplement adsorbés sur la surface d'une lamelle en verre. La vitesse moyenne des filaments augmente avec la concentration d'ATP. Au-delà de $200 \mu\text{M}$ environ, la vitesse sature autour de $3 - 4 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. La vitesse des filaments dépend également de la force ionique de la solution et de son pH : la motilité disparaît complètement lorsque la concentration en chlorure de potassium dans la solution excède 100mM , et lorsque le pH n'est pas compris entre 6,5 et 9,5.

De nombreuses variations autour de ce protocole initial ont ensuite été proposées. Par exemple, la densité des myosines peut être contrôlée précisément en utilisant un accrochage spécifique à l'aide d'anticorps, au lieu d'adsorption non spécifique (Winkelmann et coll., 1995). L'utilisation d'anticorps ciblant différentes régions de la molécule donne des vitesses de filaments différentes. Dans la configuration optimale, les filaments atteignent des vitesses de $10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, à une température de 30°C . La température a également un effet important sur la vitesse des filaments (Fig. I.13(a)). A basse température, la distribution de vitesse est large et ne présente pas de pic bien défini. Au delà de $17,5^\circ$, un pic apparaît dans la distribution, permettant de définir de manière pertinente une vitesse moyenne des filaments. Cette vitesse moyenne augmente significativement, de 2 à $10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ entre 20 et 30° (Bourdieu et coll., 1995b).

2.2 Processivité

La distribution de vitesses dépend aussi de la densité de myosines II sur la surface (Fig. I.13(c)) (Bourdieu et coll., 1995b). L'apparition d'un pic clairement identifiable dans la distribution se produit pour des densités supérieures à $300 \mu\text{m}^{-2}$ (Fig. I.13(b)). Au-delà de $450 \mu\text{m}^{-2}$, la vitesse sature à une valeur maximale d'environ $5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. En-deçà de cette densité de saturation, la distribution des vitesses est large, et la valeur maximale décroît linéairement avec la densité. Par contraste, le

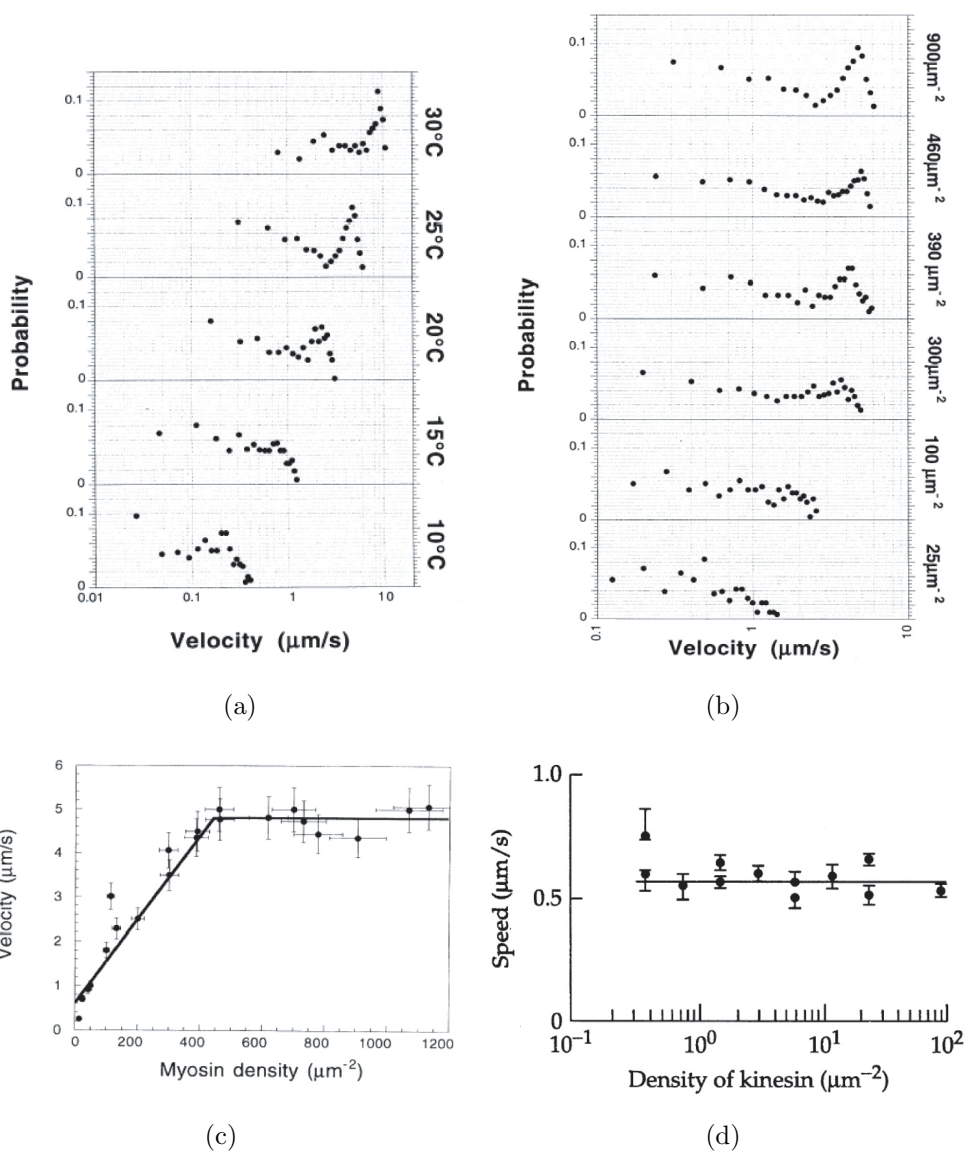


FIG. I.13: Vitesses de filaments en test de motilité in vitro en fonction de différents paramètres

(a) Distribution de la vitesse des filaments interagissant avec des myosines II à différentes températures.

(b) Distribution de la vitesse des filaments interagissant avec des myosines II à différentes densités de moteurs sur la surface, à une température de 25°.

(c) Vitesse des filaments d'actine en fonction de la densité de myosines II.

(d) Vitesse de microtubules glissant sur un tapis de kinésines, en fonction de la densité de kinésines sur la surface.

(a), (b), (c) : extraits de (Bourdieu et coll., 1995b) ; (d) : extrait de (Howard, 2001).

même type d'expérience, effectué avec la kinésine et des microtubules, montre que la vitesse des microtubules est constante quelle que soit la densité de moteurs. Même à faible densité, les microtubules se déplacent le long de la surface avec une vitesse

égale à la vitesse asymptotique (Fig. I.13(d)).

Cette propriété définit la processivité du moteur considéré. La kinésine est processive, car une molécule unique de kinésine est capable de faire avancer un microtubule (Howard et coll., 1989). La myosine II, comme beaucoup d'autres myosines comme par exemple la myosine 1c, n'est pas processive : ce moteur doit agir en groupe pour générer un mouvement continu d'un filament d'actine⁷. La notion de processivité permet d'introduire le concept de "rapport de charge"⁸, désignant la fraction de la durée de son cycle enzymatique qu'un moteur individuel passe attaché au filament (Howard, 2001). Les moteurs processifs sont caractérisés par un rapport de charge élevé; ils peuvent maintenir un attachement constant au filament et fonctionner seuls. En revanche, les moteurs non processifs ont un faible rapport de charge; si un seul moteur est impliqué, le filament est libre la plupart du temps, et il diffuse de manière aléatoire pendant ces intervalles. Il faut donc un nombre important de moteurs pour produire un mouvement continu.

Si τ_{on} est la durée de l'attachement d'un moteur et k_{ATP} son taux d'hydrolyse, le rapport de charge vaut

$$r = \tau_{\text{on}} k_{\text{ATP}}. \quad (\text{I.5})$$

Dans le cas de la myosine II, dans un test de motilité, c'est-à-dire sans force extérieure, le rapport de charge peut être estimé comme suit : la vitesse d'un filament, produite par les moteurs, vaut $V = \delta/\tau_{\text{on}}$ où δ est le déplacement induit par un moteur. En conséquence,

$$r = \frac{\delta k_{\text{ATP}}}{V}. \quad (\text{I.6})$$

En prenant $V = 5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{\text{ATP}} = 25 \text{s}^{-1}$ et $\delta = 5 \text{nm}$, on obtient un rapport de charge de 2,5%. Les expériences en molécule unique que nous avons mentionnées (Veigel et coll., 2003) ainsi que des mesures sur les muscles (*cf* p. 32), montrent que le rapport de charge varie lorsqu'une force est appliquée au moteur.

2.3 Motilité des sous-fragments

Des tests de motilité *in vitro* ont également été effectués avec les sous-fragments de la myosine II. Seuls les HMM et les S1 produisent de la motilité, ce qui est cohérent avec le fait que la partie motrice de la myosine se trouve dans le fragment S1. Les vitesses des filaments varient de manière importante en fonction des fragments utilisés (Tab. I.2). Les HMM produisent une vitesse moyenne plus importante que les myosines entières et les fragments S1. La différence entre HMM et S1 peut s'expliquer par une différence d'attachement au substrat : les HMM peuvent se fixer par le fragment S2, et la majorité des têtes sont donc libres au-dessus de la surface pour interagir avec les filaments. Les fragments S1 ne peuvent profiter d'une telle orientation favorable : un plus grand nombre de têtes sont donc susceptibles de se lier à l'actine sans être capables de produire du mouvement.

⁷Il ne faut pas en conclure que toutes les myosines sont non processives. La myosine V, par exemple, est processive (Mehta et coll., 1999; Veigel et coll., 2005)

⁸Traduction de l'expression "duty ratio" utilisée dans la littérature anglophone

Fragment	Vitesse moyenne ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
Myosines entières en filaments	$3,9 \pm 0,8$
Myosines entières solubles	$3,5 \pm 0,6$
HMM	$7,5 \pm 1,1$
S1 (digestion par la papaïne)	$1,8 \pm 0,3$

TAB. I.2: **Vitesse moyenne de filaments d'actine mesurée in vitro avec différents fragments de la myosine II**

Les valeurs sont issues de (Toyoshima et coll., 1987). Les expériences sont effectuées à 30°C .

Pour expliquer la différence de vitesse entre les myosines entières et les HMM, des tests de motilité ont été effectués avec des mélanges à différentes proportions de HMM et de LMM (Guo et Guilford, 2004). La vitesse moyenne des filaments d'actine décroît lorsque la proportion de LMM augmente, et devient égale à la vitesse mesurée avec des myosines entières pour un rapport LMM/HMM supérieur à 3 (Fig. I.14(a)). Cet effet dépend de la force ionique de la solution, et devient négligeable pour des forces ioniques physiologiques (environ 180 mM ; Fig. I.14(b)). Ces résultats indiquent que des interactions non physiologiques d'origine électrostatique entre l'actine et la queue de la myosine pourraient être à l'origine de la différence de vitesse *in vitro* entre la myosine entière et les HMM. Il est intéressant de noter que dans cette étude, les vitesses maximales mesurées atteignent $14 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ lorsque la force ionique est optimale, et que la vitesse moyenne sans LMM est supérieure à $10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Ces valeurs sont bien supérieures à celles mesurées par (Toyoshima et coll., 1987) (*cf* tableau I.2), ce qui souligne la grande variabilité inhérente aux expériences *in vitro*, dont les résultats dépendent beaucoup des détails des protocoles expérimentaux et de la qualité des préparations de protéines.

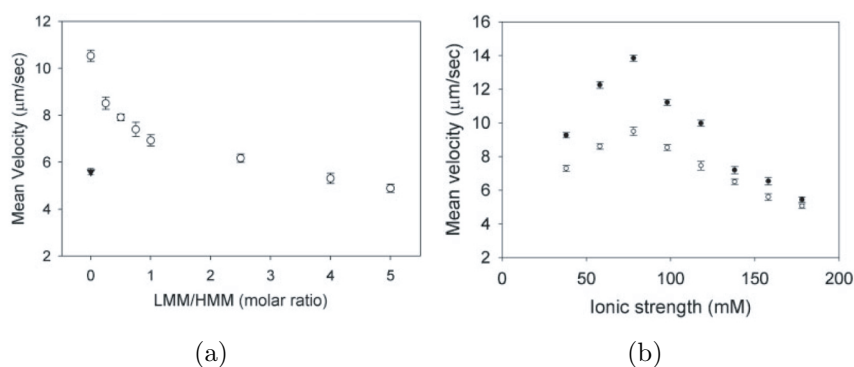


FIG. I.14: **Expériences de motilité in vitro avec un mélange HMM-LMM**

(a) Vitesse moyenne des filaments en fonction de la proportion de LMM. Le symbole noir indique la vitesse mesurée avec des myosines entières

(b) Effet de la force ionique. Ronds noirs : vitesse le long d'une surface uniquement couverte de HMM. Ronds blancs : même expérience avec un mélange équimolaire HMM/LMM. D'après (Guo et Guilford, 2004)

C Modèle du fonctionnement d'une myosine

1 Modèle du coup de force

L'ensemble des observations que nous avons présentées jusqu'ici a conduit à l'élaboration d'un modèle détaillé, dit modèle de "coup de force"⁹, pour décrire le mécanisme de production de travail mécanique par une tête de myosine. Ce modèle repose sur un couplage fort entre les différentes étapes du cycle mécanique de la molécule et les événements de nature biochimique faisant transiter la molécule entre différents états nucléotidiques¹⁰. La figure I.15(a) décrit le modèle du coup de force dans sa version la plus classique. En l'absence d'ATP, la myosine est fortement liée

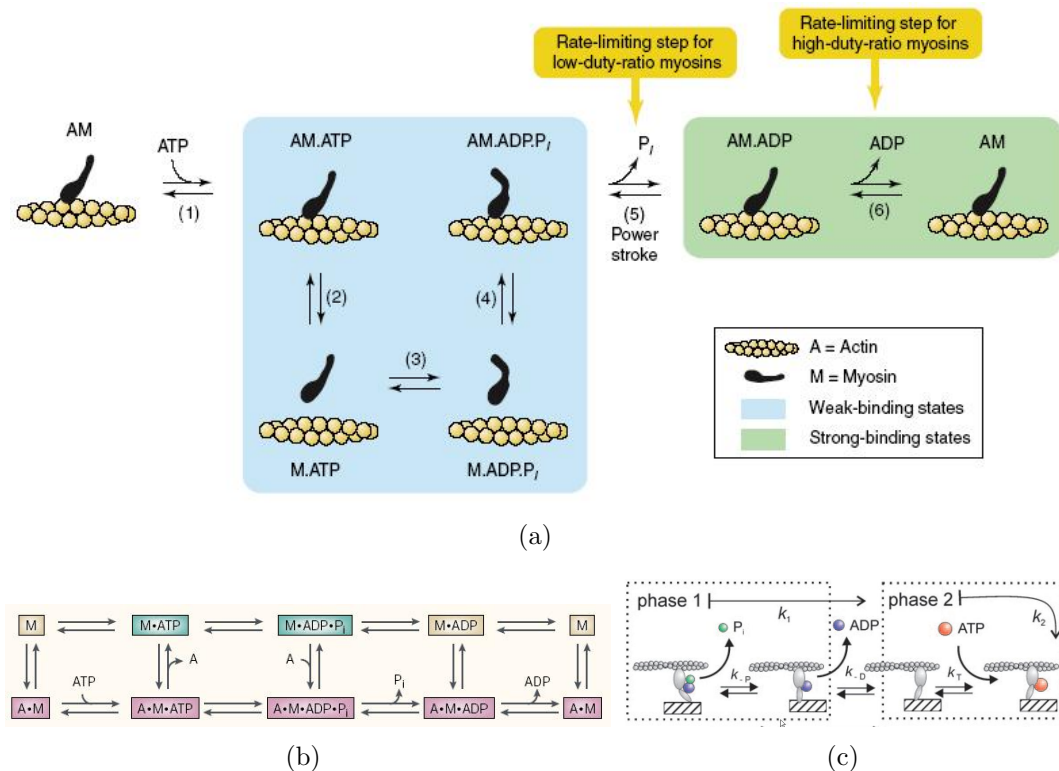


FIG. I.15: **Modèle du coup de force d'une tête de myosine**

(a) Production de force par la myosine avec un couplage fort entre étapes biochimiques et étapes mécaniques. Extrait de (Cruz et Ostap, 2004)

(b) Illustration de l'ensemble des états myosine-actine-nucléotides possibles. Le chemin simplifié illustré en (a) omet les états surlignés en jaune. Extrait de (Spudich, 2001).

(c) Modification du modèle illustré en (a) incluant la production de force en deux étapes. (Capitanio et coll., 2006)

⁹Traduction de l'expression anglaise "power stroke"

¹⁰Notons que l'idée selon laquelle le mécanisme de fonctionnement d'une myosine implique un couplage fort entre le cycle mécanique et le cycle biochimique n'est pas universellement acceptée (Ishijima et coll., 1998). Des mécanismes alternatifs ont été proposés, mettant en jeu un "couplage faible" entre l'activité mécanique et biochimique de la myosine (Yanagida et coll., 2000; Yanagida et Iwane, 2000; Kitamura et Yanagida, 2003).

l'actine (état AM). La fixation d'ATP (AM.ATP) diminue l'affinité de la myosine pour l'actine et provoque la dissociation du complexe actine myosine (M.ATP). L'hydrolyse de l'ATP en ADP et P_i provoque un changement conformationnel "armant" la myosine pour la production de force à une étape ultérieure du cycle. A ce stade, la myosine est en équilibre rapide avec un état faiblement lié (AM.ADP. P_i). Le coup de force, changement conformationnel produisant une force, est associé à la libération du phosphate inorganique, et au passage vers un état fortement lié à l'actine. La libération de l'ADP ramène ensuite le complexe acto-myosine au stade initial du cycle. Ici, la force n'est supposée être générée qu'en une étape, mais des expériences récentes (*cf* p. 18) suggèrent que le coup de force s'effectue en deux étapes successives correspondants à deux changements conformationnels distincts associés respectivement à la libération de P_i et d'ADP (Fig. I.15(c)).

En termes mécaniques, la production de force est interprétée de la manière suivante : l'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement conformationnel qui met sous tension un ressort interne de la myosine (Fig. I.16). Dans cet état contraint la myo-

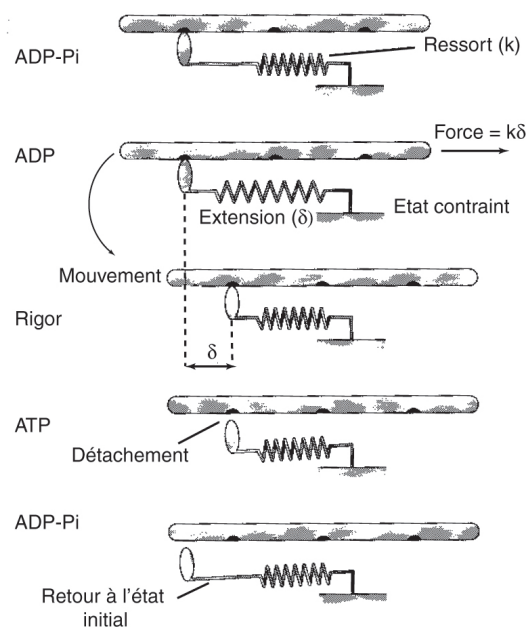


FIG. I.16: **Interprétation mécanique du modèle du coup de force**

La libération des produits d'hydrolyse de l'ATP entraîne des changements conformationnels internes à la molécule, d'amplitude δ , qui mettent sous tension un ressort interne de raideur k . Sous l'effet de la force exercée par celui-ci, le filament d'actine est mis en mouvement, ce qui relâche le ressort. La fixation d'une molécule d'ATP provoque ensuite le détachement de la myosine. Adapté de (Howard, 2001)

sine exerce une force $k\delta$ sur le filament d'actine. Dans la configuration d'un test de motilité (Fig. I.16), cette force met en mouvement le filament, relaxant ainsi l'énergie mécanique stockée dans la molécule. Remarquons que le ressort pertinent peut être un élément flexible couplé à la queue de la myosine, et donc en série avec celle-ci, et que la myosine peut mettre en mouvement une "cargaison" accrochée à sa queue,

l'actine restant fixe. Cette situation reflète par exemple la configuration du moteur de l'adaptation des cellules ciliées de l'oreille interne (*cf* p. 41.)

Le cheminement très déterministe que nous venons de décrire est évidemment une simplification de ce qui se passe réellement aux échelles microscopiques, où les fluctuations jouent un rôle fondamental. Le cycle mécano-chimique qui associe l'hydrolyse d'une molécule d'ATP à un coup de force doit plutôt être vu comme la séquence la plus probable parmi tous les états possibles du complexe acto-myosine, chaque transition entre deux états étant réversible (Fig. I.15(b)). Pour la myosine II, les constantes cinétiques de tous ces équilibres ont été mesurées (Howard, 2001, p. 235).

Ce cycle est supposé être conservé chez toutes les myosines. La différence entre les différents types de myosines vient des valeurs des taux de transition entre les différentes étapes du cycle, adaptés à la fonction physiologique du moteur (Cruz et Ostap, 2004). Par exemple, puisque les moteurs non processifs passent une grande fraction de leur temps détachés ou faiblement attachés à l'actine, l'étape cinétiquement limitante du cycle est la libération du phosphate inorganique (étape 5 sur la figure I.15(a)), à l'issue de laquelle la myosine est fortement liée à l'actine. Inversement, dans le cas des moteurs processifs, l'étape limitante doit être la libération d'ADP. Le moteur passe donc une fraction importante de son cycle dans l'état ADP fortement lié à l'actine sans pouvoir se détacher. Les expériences de molécule unique où une charge est appliquée au moteur lorsqu'il est accroché montrent que l'application d'une force, en biaisant l'équilibre de l'étape de libération de l'ADP, peut modifier le rapport de charge d'un moteur (Fig. I.10(c)).

2 Propriété de mécanosensibilité de la myosine

Il a été suggéré que l'existence d'un changement conformationnel lié à la libération d'ADP constitue un mécanisme pour expliquer la sensibilité des myosines à une charge extérieure (Cremona et Geeves, 1998; Coluccio et Geeves, 1999). Le blocage de la myosine dans un état fortement lié à l'ADP et à l'actine, par une force opposée au déplacement induit par le moteur, ralentit sa progression à travers les étapes de son cycle catalytique. Une telle propriété permet ainsi à une myosine d'ajuster son taux d'hydrolyse biochimique aux conditions mécaniques qui lui sont imposées (Veigel et coll., 2003). Il est établi de longue date que les muscles possèdent une telle caractéristique, connue sous le nom d'"effet Fenn" (Fenn, 1923, et *cf infra* p. 32). *In vivo*, dans les muscles ou dans les cellules ciliées de l'oreille interne, le maintien d'une majorité de têtes de myosine dans un tel état fortement lié à l'actine représente un moyen économique, en termes de consommation d'ATP, de maintenir le système sous tension.

Un système moléculaire est mécanosensible s'il peut exister sous deux états différents, dont l'équilibre est perturbé par l'application d'une force au système. Pour cela, il faut que l'application d'une force puisse apporter de l'énergie mécanique au système, c'est-à-dire qu'elle soit associée à un changement conformationnel dans la direction de la force (Howard, 2001). Considérons le cas simple d'un système bis-

table possédant un degré de liberté interne élastique caractérisé par une raideur k , pour lequel la transition entre les états 1 et 2 implique un déplacement δ . Comme nous venons de le voir, une telle situation peut représenter une myosine accrochée à l'actine, soit liée à l'ADP soit sans nucléotide (Fig. I.17(a)). Une telle configuration modélise également un canal ionique, existant soit à l'état ouvert soit à l'état fermé, couplé à un ressort (Fig. I.17(b)). Le profil énergétique du système a l'allure

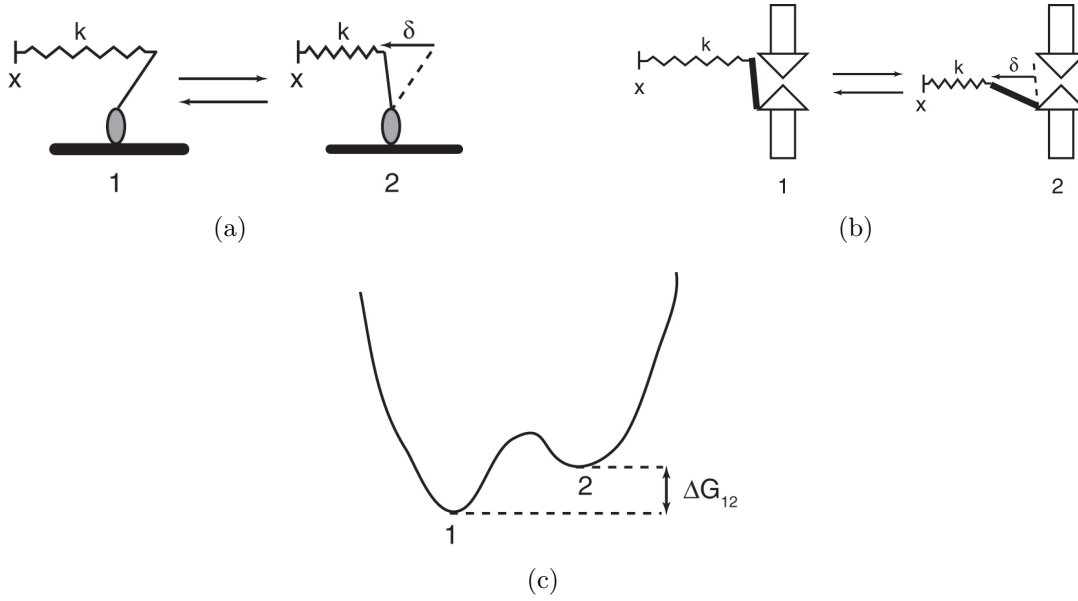


FIG. I.17: Exemples de systèmes mécanosensibles

Une myosine liée à l'actine (a), en état *rigor* (1) ou ADP (2), et un canal ionique lié à un élément élastique (b), pouvant exister en état fermé (1) ou ouvert (2), sont deux exemples de systèmes mécanosensibles. Un déplacement x imposé étirant un élément élastique de raideur k favorise énergétiquement l'état 2, qui implique un déplacement δ relaxant la tension dans le ressort, par rapport à l'état 1.

(c) Profil énergétique correspondant : les états stables 1 et 2 sont séparés par une barrière d'activation. Le rapport des probabilités d'occupation des états 1 et 2 est déterminé par leur différence d'enthalpie libre ΔG_{12}

représentée figure I.17(c). Les états 1 et 2 sont caractérisés par les enthalpies libres

$$G_1 = \mu_1 + \frac{1}{2}kx^2 \quad (\text{I.7})$$

$$G_2 = \mu_2 + \frac{1}{2}k(x - \delta)^2, \quad (\text{I.8})$$

où μ_1 et μ_2 correspondent aux enthalpies libres intrinsèques dans chacun des deux états, et x est l'extension de l'élément élastique du système. A l'équilibre thermodynamique, les probabilités d'occupation p_1 et p_2 vérifient, outre $p_1 + p_2 = 1$:

$$\frac{p_2}{p_1} = e^{-\left(\frac{\Delta G_{12}}{k_B T}\right)}, \quad (\text{I.9})$$

avec $\Delta G_{12} = G_2 - G_1 = k\delta(x - x_0)$, où on a posé $x_0 = \delta/2 + (\mu_2 - \mu_1)/(k\delta)$, qui définit la position moyenne du système en l'absence de force.

On peut alors obtenir :

$$p_2 = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{-k\delta(x-x_0)}{k_B T}\right)}}, \quad (\text{I.10})$$

dont l'allure est tracée figure I.18(a).

La force moyenne à appliquer au système pour le maintenir à une position x se calcule par :

$$\begin{aligned} \langle f \rangle &= p_1 \frac{\partial G_1}{\partial x} + p_2 \frac{\partial G_2}{\partial x} \\ &= kx - k\delta p_2. \end{aligned} \quad (\text{I.11})$$

La relation force-déplacement du système est non linéaire. La largeur de la zone non linéaire est déterminée par δ (Fig. I.18(b)).

On peut calculer la raideur du système :

$$\bar{k} = \frac{\partial \langle f \rangle}{\partial x} = k - \frac{(k\delta)^2}{k_B T} p_2(1 - p_2). \quad (\text{I.12})$$

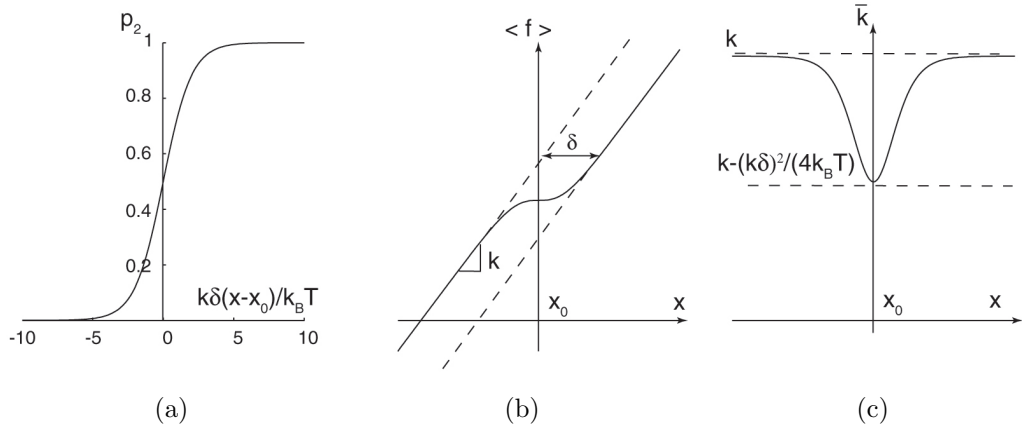


FIG. I.18: **Propriétés d'un système mécanosensible**

(a) Fonction p_2 déterminant la probabilité d'occupation de l'état 2.

(b) La relation force-déplacement du système est non linéaire; l'écart entre les deux branches asymptotiques de pente k , qui détermine la largeur de la zone non linéaire, vaut δ .

(c) Assouplissement lié à la mécanosensibilité du système : la raideur \bar{k} du système diminue au voisinage de x_0

Cette raideur n'est pas constante et dépend de x par le deuxième terme, qui est toujours positif. En raison de l'existence de deux états dont la probabilité d'occupation dépend de la force, le système apparaît de manière effective moins rigide que l'élément élastique qu'il contient, sur une zone de déplacement autour de x_0 de

l'ordre de $k_B T / (k\delta)$ (Fig. I.18(c)). L'existence d'un tel assouplissement a été observée en molécule unique sur une myosine 1 ("stroke compliance") (Batters et coll., 2004b). Si N moteurs opèrent en parallèle de manière indépendante, la raideur totale vaut $k_N = N\bar{k}$. Un assouplissement apparent a également été mesuré sur des fibres musculaires et attribué à l'existence de deux états de la myosine musculaire liés à l'actine, le passage d'un état à l'autre s'accompagnant d'un déplacement relativement au filament d'actine (Huxley et Simmons, 1971). Cet assouplissement a également été établi sur les touffes ciliaires des cellules ciliées mécanosensibles de l'oreille interne des vertébrés, et attribué à la mécanosensibilité du canal de transduction ("gating compliance") (Howard et Hudspeth, 1988; Martin et Hudspeth, 2001).

D Myosines dans des structures organisées

1 Myosine II et contraction musculaire

1.1 Machinerie contractile des muscles

Chez les vertébrés il existe trois types de muscles : les muscles squelettiques (attachés aux os, il s'agit par exemple de tous les muscles que nous utilisons consciemment pour effectuer des mouvements), les muscles cardiaques, et les muscles lisses (responsables de la contraction plus lente d'organes comme l'intestin, l'estomac, l'utérus...). Les muscles squelettiques et cardiaques sont des muscles striés (Fig. I.19). Chez les insectes, les muscles qui contrôlent le battement des ailes sont également striés, mais sont appelés muscles fibrillaires. Dans tous ces types de muscles, l'origine moléculaire de la contractilité est fondée sur l'opération de différentes isoformes de myosine II. Nous allons dans ce paragraphe donner quelques éléments de la structure et du mécanisme de contractilité des muscles squelettiques, dont l'organisation est extrêmement similaire à celle des muscles cardiaques et des muscles fibrillaires d'insecte.

Une fibre musculaire est une cellule multinucléée formée de l'assemblage en parallèle de myofibrilles, structures cylindriques à peu près aussi longues que la fibre et de 1 à 2 μm de diamètre (Fig. I.19). Une myofibrille est elle-même une chaîne d'éléments identiques, longs d'environ 2,2 μm au repos, appelés sarcomères. Le sarcomère est l'élément constitutif élémentaire de la fibre musculaire. Chaque sarcomère est délimité par deux "disques Z", visibles en microscopie électronique comme deux lignes noires fines. Il est constitué d'un assemblage précisément arrangé de filaments fins et épais, présentant une zone de recouvrement. Les filaments fins sont des filaments d'actine liés à un certains nombres de protéines régulatrices, parmi lesquelles un complexe formé de la tropomyosine et de la troponine. Ce complexe se lie à l'actine par la troponine, dans une configuration telle que la tropomyosine occupe le site de fixation de la myosine à l'actine. Les filaments fins sont ancrés par le bout barbé aux disques Z, et le bout pointu est dirigé vers le centre du sarcomère.

Les filaments épais sont des filaments bipolaires de myosines II assemblées par leur queues. Ils sont liés entre eux par des protéines spécifiques localisées au niveau

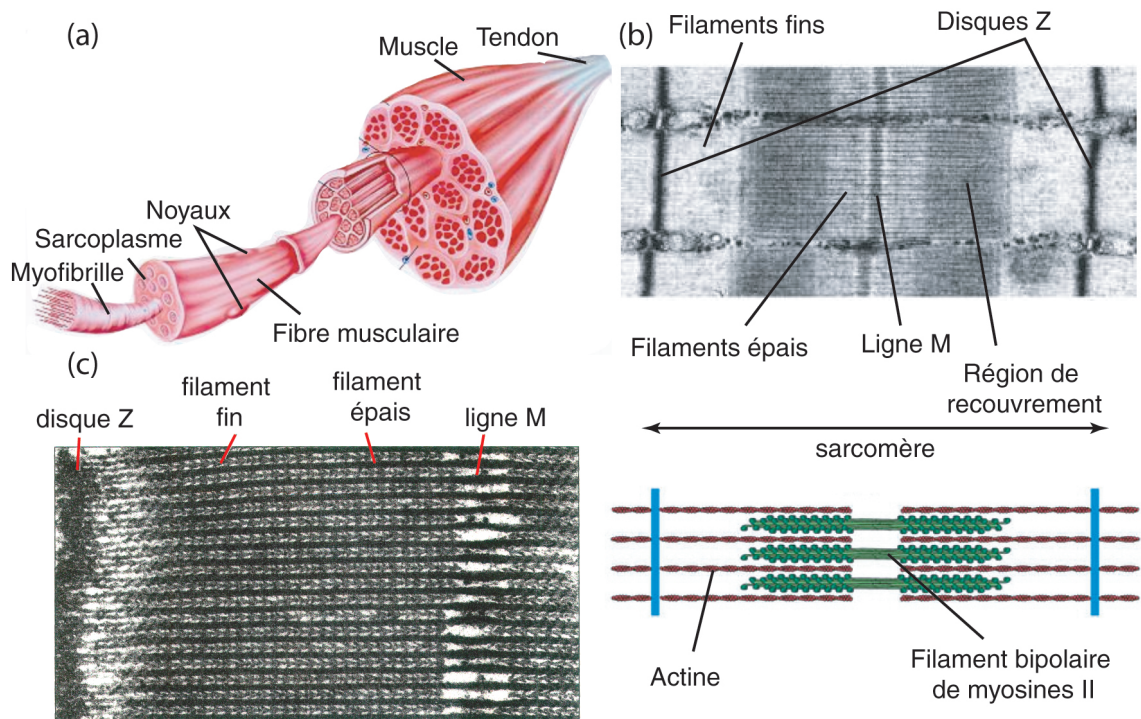


FIG. I.19: **Structure du muscle squelettique**

(a) Un muscle est constitué de nombreuses fibres musculaires, elle-mêmes regroupant un grand nombre de myofibrilles, dont l'apparence striée est due à une alternance de bandes claires et sombres (source : <http://www.shelfieldpeonline.co.uk/>).

(b) Chaque myofibrille est constituée de l'arrangement en série d'un grand nombre de sarcomères. On voit ici un cliché de microscopie électronique d'un sarcomère (source : <http://www.ks.uiuc.edu/>) et schéma interprétatif (adapté de (Alberts et coll., 1994)).

(c) Vue agrandie d'un sarcomère de muscle d'insecte au microscope électronique. On voit bien l'alternance de filaments fins et épais, ainsi que les têtes de myosine II formant des "ponts" transversaux entre les deux filaments (extrait de (Alberts et coll., 1994)).

de la "ligne M", la ligne centrale du sarcomère, et au disque Z par une protéine géante, la titine. De part et d'autre de la ligne M, les têtes des myosines sont, de même que les filaments fins, orientées en sens inverse. Dans la zone de recouvrement entre les filaments fins et épais, les myosines peuvent interagir avec l'actine. Sous l'action des myosines, les filaments fins et épais glissent les uns par rapport aux autres, ce qui provoque la contraction du sarcomère (Fig. I.20(a)).

In vivo, un muscle n'est pas en permanence en contraction. Il est nécessaire de l'activer pour déclencher le développement d'une tension contractile. La régulation de l'activité contractile est un processus complexe (Gordon et coll., 2000, pour une revue). Le mécanisme principal d'activation d'une fibre implique une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium en réponse à un influx nerveux. La fixation d'ions calcium à la troponine induit un changement de structure de la troponomyosine qui libère l'accès au filament d'actine pour les myosines, ce qui donne lieu la production d'une force. Dans des conditions d'activation totale ($pCa=5$ et

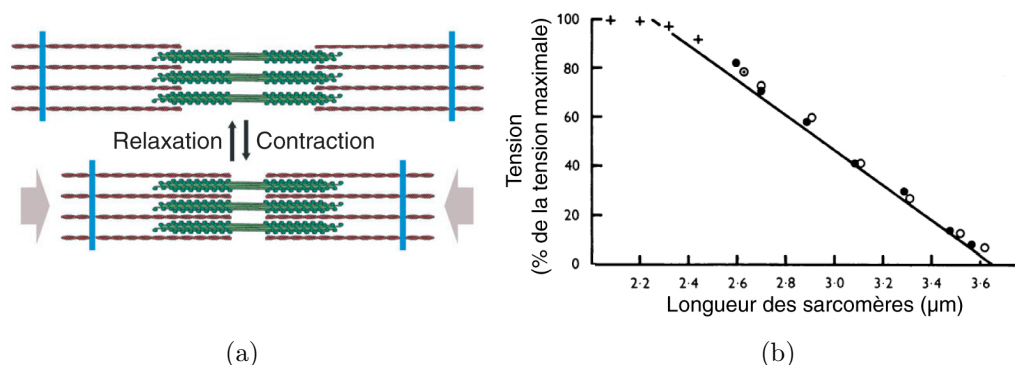


FIG. I.20: **Production de travail mécanique par un muscle**

(a) En interagissant avec les filaments d'actine, les myosines des filaments épais exercent une force qui produit un glissement relatif des filaments fins et épais, et aboutit à la contraction du sarcomère.

(b) Tension produite par une fibre de longueur imposée en fonction de la longueur moyenne de ses sarcomères : au-delà de 2,3 μm la tension décroît linéairement avec la longueur des sarcomères. Dans cette région, l'étirement des sarcomères provoque une diminution du recouvrement entre les filaments fins et épais, et donc une diminution du nombre de myosines disponibles. Adapté de (Gordon et coll., 1966)

pMgATP=2,5 typiquement)¹¹, la force exercée par une fibre musculaire décroît linéairement lorsque la longueur moyenne imposée des sarcomères augmente (Fig. I.20(b)) (Gordon et coll., 1966; Hellam et Podolsky, 1969), ce qui indique que la force est proportionnelle à la longueur de la zone de recouvrement entre filaments fins et épais, ou encore au nombre de têtes de myosines capables d'interagir avec le filament. Dans ces conditions, la tension active totale est la somme des forces produites indépendamment par chaque moteur.

Pour finir ce paragraphe de généralités sur les muscles, le tableau I.3 fournit les ordres de grandeur pertinents associés à certaines propriétés morphologiques et mécaniques du muscle.

1.2 Relation force-vitesse des fibres musculaires

Comportement hyperbolique

Dans un muscle, la production de force s'accompagne de la contraction des fibres musculaires. Deux types de mesures sont effectuées pour caractériser les propriétés d'un muscle à l'état stationnaire. Dans le premier cas, on fixe la longueur du muscle, et on mesure la force nécessaire pour maintenir la longueur constante. On parle alors de contraction **isométrique**. On peut aussi imposer une force constante et mesurer la longueur du muscle en fonction du temps. Ce type de mesure est appelé contraction **isotonique** (Fig. I.21(a), insert).

La relation force-vitesse d'un muscle s'obtient en traçant la vitesse de contraction en fonction de la force appliquée (Fig. I.21(a)) (A.V.Hill, 1938). La vitesse de

¹¹Pour une espèce chimique X, on définit $pX = -\log[X]$

Propriété	Valeur	Référence
Densité de filaments épais dans une section transverse	500 μm^{-2}	(Howard, 2001, p. 137&275)
Densité de filaments fins dans une section transverse	950 μm^{-2}	
Nombre de myosines par demi-filament épais	300	
Tension développée par unité de surface transverse	150 – 250 kPa	(Shimamoto et coll., 2007) (Higuchi et coll., 1995)
Longueur d'un sarcomère relaxé (muscle de lapin)	2,2 μm	(Alberts et coll., 1994)
Contraction max. d'un sarcomère	100 nm	(Shimamoto et coll., 2007)
Taux de contraction max.	4 – 5 %	
Force dans un filament d'actine (activation complète)	$\sim 1 \text{ pN} \cdot \text{kPa}^{-1}$ (max. $\sim 200 \text{ pN}$)	(Howard, 2001, p.137)

TAB. I.3: Quelques valeurs numériques utiles concernant les muscles

contraction est maximale lorsque le muscle n'est soumis à aucune charge, et elle s'annule à la tension isométrique. La vitesse de contraction dépend de la force selon une décroissance hyperbolique. Ce comportement est décrit par une relation phénoménologique connue sous le nom de "formule de Hill" :

$$(P + a)(V + b) = (P_0 + a)b$$

où P est la charge, V la vitesse de contraction, et P_0 la valeur de tension isométrique. Les coefficients dépendent de l'animal d'où provient le muscle et de la température.

Il a été proposé un modèle dans lequel chaque myosine produit un travail mécanique de manière indépendante (Huxley, 1957; Huxley, 1969; Howard, 2001, p.269-276). Chaque tête de myosine liée à l'actine se comporte comme un élément élastique, qui produit une force sur le filament proportionnelle à son extension. Une tête s'attache et se détache de l'actine avec des taux, respectivement k_{on} et k_{off} , dépendants de la position relative des filaments fins et épais, et donc de manière effective dépendants de la force exercée sur la myosine. Avec les taux illustrés figure I.21(b), le modèle reproduit les caractéristiques du modèle du coup de force exposé plus haut : une myosine a un taux d'attachement élevé dans une région d'extension δ où elle produit une force importante sur la myosine. Lorsque cette contrainte est relaxée par le déplacement du filament, le taux de détachement devient très élevé, ce qui empêche la production d'une force dans le sens inverse. Avec ce choix de k_{on} et k_{off} , le modèle reproduit le comportement hyperbolique de la relation force-vitesse.

La dépendance des taux d'attachement et de détachement avec la force qui apparaît dans ce modèle reçoit le soutien d'observations expérimentales à différents niveaux. Il a été observé que le travail mécanique et la chaleur produits par un muscle sont plus importants lorsqu'il se contracte qu'à l'état isométrique, phéno-

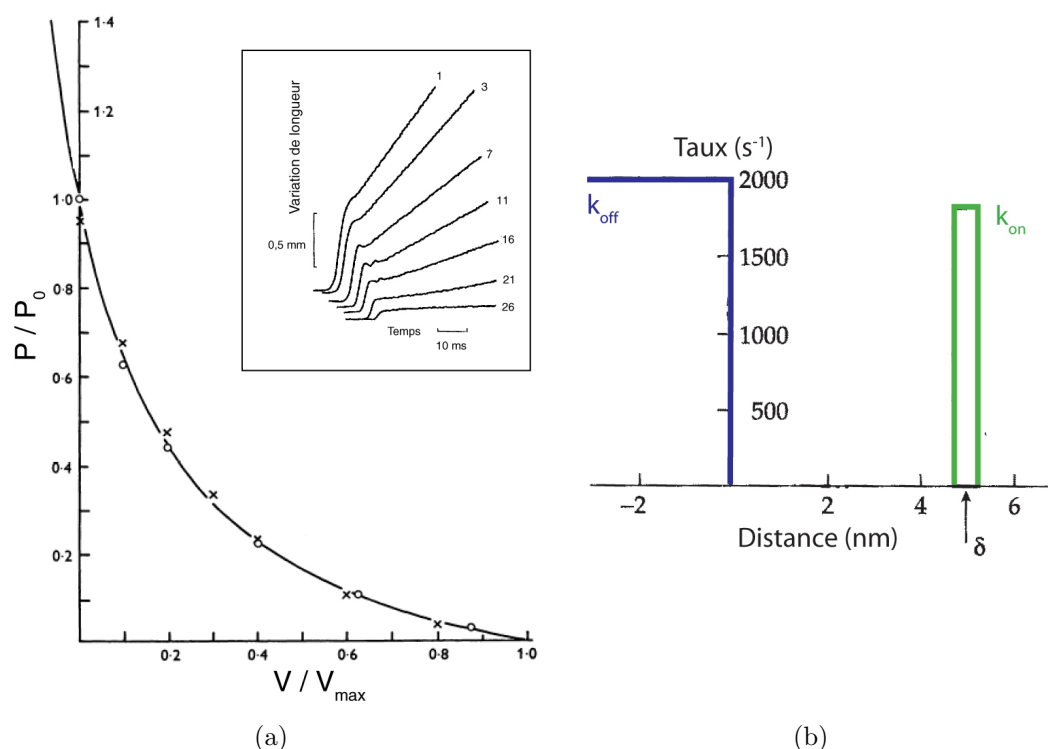


FIG. I.21: **Relation force-vitesse du muscle squelettique**

(a) Insert : Evolution temporelle de la longueur d'une fibre soumise à différentes charges : les chiffres à côté de chaque courbe indiquent la masse en grammes attachée à la fibre. Après un saut initial correspondant à la réponse élastique rapide des tendons lorsque la charge est appliquée, le muscle se contracte avec une vitesse constante dépendant de la charge appliquée. (Adapté de (Howard, 2001)). La vitesse de contraction peut être tracée pour différentes charges pour donner la relation force-vitesse du muscle. Ligne continue : fonction hyperbolique donnant le meilleur ajustement aux points expérimentaux (non représentés) obtenus sur le muscle de la grenouille à 0° . Ronds : Ajustement du modèle de A.F.Huxley de 1957. (Les croix sont des valeurs calculées à l'aide d'une autre fonction empirique). Extrait de (Huxley, 1974).

(b) Le comportement hyperbolique de la relation force-vitesse est bien décrit par le modèle du coup de force (*cf* p. 25), en attribuant à la myosine des taux d'attachement k_{on} et de détachement k_{off} dépendants de la position relative de la myosine et du filament. L'origine des déplacements est à la position où la myosine n'est pas contrainte. Lorsqu'elle s'accroche à l'actine, la myosine change de conformation, et se trouve dans un état contraint. Elle se décroche après qu'un mouvement relatif de la myosine et du filament a relaxé la contrainte. La tête du moteur étant supposée élastique, les taux dépendent de manière effective de la force qui est appliquée au moteur. Extrait de (Howard, 2001).

mène qui a reçu le nom d'“effet Fenn” (Fenn, 1924). Cela implique que lorsque le muscle se contracte, en réponse à une diminution de la charge qui lui est imposée, le taux d'activité ATPasique moyen k_{ATP} des moteurs augmente. Comme

$$\frac{1}{k_{ATP}} = \frac{1}{k_{on}} + \frac{1}{k_{off}}, \quad (I.13)$$

la dépendance avec la force de k_{ATP} implique celle de k_{on} et k_{off} ¹². Par ailleurs, comme nous l'avons déjà mentionné (*cf supra* p. 18 et fig. I.10(c)), des expériences en molécule unique ont montré directement que le taux de décrochage k_{off} d'une myosine II individuelle dépend de la force qui lui est appliquée (Veigel et coll., 2003). Enfin, des mesures de la raideur instantanée d'une fibre musculaire en contraction (Ford et coll., 1985) ont montré que la raideur de la fibre diminue quand la vitesse de contraction augmente; la raideur en l'absence de charge vaut environ 35 % de la raideur en contraction isométrique. Ces observations suggèrent que le nombre moyen N de myosines liées à l'actine augmente lorsqu'on s'oppose à la contraction musculaire. Celui-ci est relié au nombre total de myosines N_{tot} par le rapport de charge des moteurs : $N = rN_{\text{tot}}$. Le rapport de charge dépend donc de la force et augmente quand les moteurs sont soumis à une force. Comme

$$r = \frac{1}{1 + \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}}, \quad (\text{I.14})$$

ces expériences appuient également l'idée d'une dépendance en force des taux d'accrochage et décrochage des moteurs.

Il est possible d'estimer le rapport de charge lorsque la force est importante (Howard, 2001). Nous savons (Eq. I.6) que pour une vitesse de contraction V ,

$$r = \frac{\delta k_{\text{ATP}}}{V}. \quad (\text{I.15})$$

De plus,

$$V = k_{\text{ATP}}\Delta, \quad (\text{I.16})$$

où Δ est la distance parcourue par un filament d'actine pendant la durée moyenne d'une hydrolyse d'ATP. Lorsque V est faible, les sites d'accrochage à l'actine défilent suffisamment lentement par rapport à un moteur pour que chacun d'eux servent de point d'accrochage et donne lieu à l'hydrolyse d'un ATP. En conséquence, $\Delta = d$, d désignant la périodicité de l'hélice d'un filament d'actine (36 nm, (Howard, 2001, ch. 16)). A faible vitesse, donc lorsqu'une force importante s'applique sur les moteurs,

$$r_{\text{max}} = \frac{\delta}{d} \sim 14 \%. \quad (\text{I.17})$$

En l'absence de force extérieure, on s'attend à un rapport de charge $r_{\text{min}} = 0,35r_{\text{max}} \sim 5 \%$, du même ordre que la valeur que nous avons estimée à partir des tests de motilité *in vitro* (*cf* p. 20).

La variation du rapport de charge est une manifestation de la propriété de mécanosensibilité des myosines dûe à l'existence de plusieurs états liés à l'actine. Lorsqu'une force importante est appliquée dans le sens opposé au mouvement naturel des moteurs, le blocage des myosines dans un état ADP générant de la force permet de maintenir une tension à faible coût en ATP. Inversement, à faible force, les myosines

¹²Remarquons que les grandeurs k_{off} et τ_{on} (défini p. 23), sont liées par $k_{\text{off}} = \frac{1}{\tau_{\text{on}}}$

peuvent effectuer leur cycle rapidement pour produire un mouvement rapide. La force active produite par les moteurs s'ajuste ainsi à la vitesse à laquelle le système contractile se déplace. Ces résultats expliquent qu'un muscle soit capable d'ajuster la force qu'il produit à la charge à laquelle il est soumis pendant la contraction : quand la charge est faible, la force produite est faible et la vitesse de contraction est grande ; inversement, quand la charge est élevée, la vitesse de contraction diminue mais la force produite augmente.

Comportement biphasique de la relation force-vitesse

Des mesures sur des fibres isolées de muscles de la grenouille, effectuées avec davantage de points dans le domaine de tension proche de la tension isométrique, ont montré que la relation force-vitesse d'une fibre musculaire ne suit pas une simple décroissance hyperbolique (Edman et coll., 1976; Edman et Hwang, 1977) (Fig. I.22(a)). Au-delà de 78% de la tension isométrique, la relation force-vitesse présente

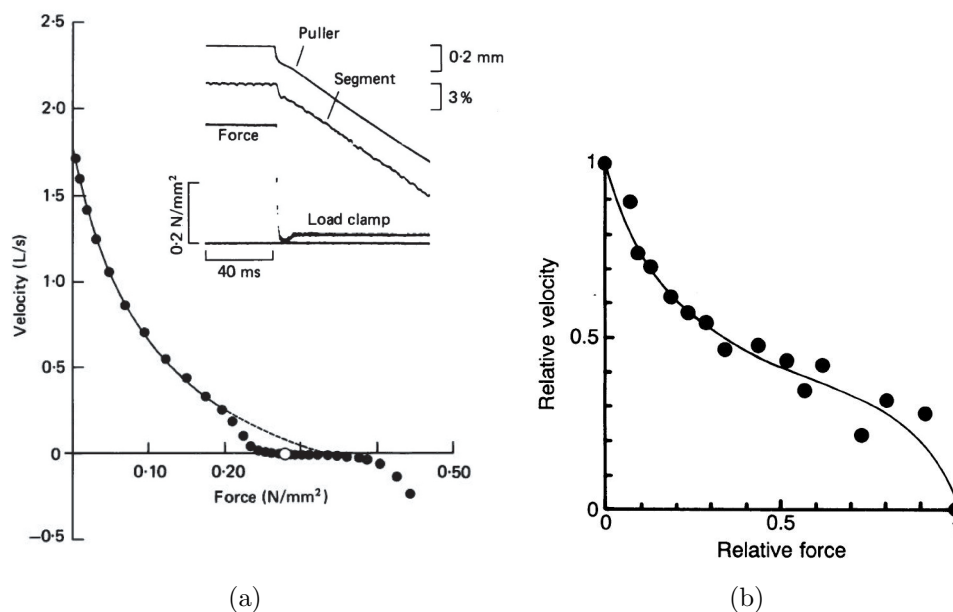


FIG. I.22: **Comportement de la relation force-vitesse au voisinage des conditions isométriques**

(a) Relation force-vitesse biphasique mesurée sur une fibre musculaire isolée de la grenouille à 0° . Jusqu'à 80% de la tension isométrique, la courbe suit la relation de Hill (ligne continue).

Insert : illustration du protocole de contraction isotonique. Le signal inférieur montre l'échelon de force imposé. La fibre entière ("Puller"), ainsi qu'un segment de la fibre ("Segment"), se contractent à vitesse constante. Extrait de (Edman, 1988).

(b) Un comportement analogue apparaît sur la relation force-vitesse de myosines *in vitro*. P_0 , la force isométrique, vaut 15 pN. Extrait de (Oiwa et coll., 1990).

une rupture de pente : la vitesse diminue plus rapidement que prévu par la relation de Hill, et la force isométrique est également plus faible. La relation force-vitesse

se prolonge continuellement pour des forces supérieures à la force isométrique, dans un premier temps avec de faibles variations de la vitesse. A plus forte charge, la vitesse d'élongation augmente de nouveau (Edman, 1988). Alors qu'à faible charge la relation force-vitesse des muscles est bien décrite par un modèle de générateurs de force indépendants (Huxley, 1957), ces observations suggèrent qu'à proximité de la tension isométrique, le comportement de l'appareil contractile change. Il a été proposé que les myosines ne puissent plus être considérées comme indépendantes et qu'à haute force, et à faible vitesse, la densité de têtes attachées à l'actine augmente, ce qui rend difficile pour les têtes non attachées de trouver un site disponible. De manière effective, le taux d'accrochage diminuerait quand la tension devient proche de la tension isométrique (Edman, 1988).

Alors que ces observations expérimentales ont été effectuées à basse température, le même comportement biphasique a été récemment observé sur les muscles de rat *in situ*, à température physiologique (Devrome et MacIntosh, 2007). La nature biphasique de la relation force-vitesse pourrait donc jouer un rôle *in vivo*. Enfin, il semble que ce phénomène soit une caractéristique intrinsèque du système actine-myosine. La relation force-vitesse, à force imposée, a été mesurée *in vitro* sur des billes couvertes de myosines avançant sur des câbles d'actine (Oiwa et coll., 1990). Cette étude utilise un microscope couplé à un rotor, qui permet d'exercer une force centrifuge connue, proportionnelle au carré de la vitesse de rotation, à la bille. La relation force-vitesse obtenue montre également un comportement hyperbolique à faible force, et s'écarte de ce comportement près de la force d'arrêt des moteurs. Bien que le nombre de moteurs impliqués dans ces expériences (4 à 40) soit très inférieur au nombre de myosines dans un demi-sarcomère (300 myosines par demi-filament épais, cf tableau I.3), le système *in vitro* préserve les caractéristiques essentielles de la relation force-vitesse d'une fibre musculaire.

1.3 Réponse transitoire d'une fibre musculaire à des changements abrupts de longueur

Le régime transitoire de la tension générée par une fibre musculaire isolée en réponse à un changement abrupt de sa longueur comporte trois phases (Fig. I.23) (Huxley et Simmons, 1971) :

1. Importante variation de la tension simultanée à l'échelon de longueur, due à la réponse d'un élément élastique passif dans les ponts actine-myosine (Tension T_1 sur la figure I.23(b)).
2. Recouvrement rapide, sur une échelle de quelques millisecondes, et partiel de la tension (Tension T_2).
3. Retour, sur une échelle de temps beaucoup plus lente, à la valeur initiale de la tension.

La courbe T_2 est non-linéaire : aux petits déplacements la tension est presque entièrement relaxée à l'issue de la phase rapide de la relaxation. Pour des déplacements plus importants, la pente de la courbe s'accroît nettement.

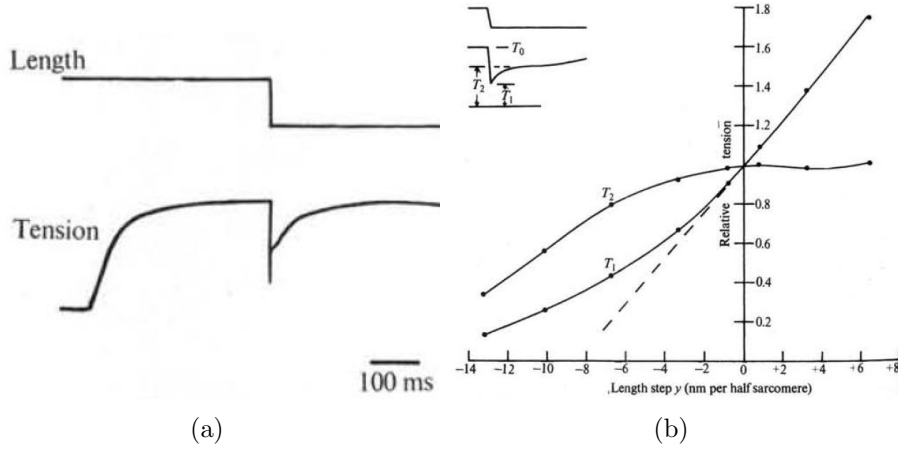


FIG. I.23: Tension développée par une fibre musculaire en réponse à un échelon de longueur

(a) Exemple d'un enregistrement montrant la totalité de la relaxation

(b) Amplitude des phases 1 et 2 de la relaxation en fonction de l'amplitude de l'échelon de longueur. En insert : Phase préliminaire de la relaxation, avec une échelle de temps dilatée. Extrait de (Huxley et Simmons, 1971)

La raideur du système aux temps courts, donnée par la dérivée de la courbe T_2 , est donc dépendante du déplacement : elle est beaucoup plus faible pour les faibles variations de longueur que pour les grands étirements. L'observation de cet assouplissement a ainsi permis dès 1971 de suggérer l'existence de plusieurs états successifs de la myosine liée à l'actine, d'affinité croissante, la transition entre deux états consécutifs étant associée à un changement conformationnel de la molécule. La non linéarité de la courbe T_2 est interprétée comme le corrélat mécanique de la mécanosensibilité des liens actine-myosine, suivant, pour un modèle simple à deux états, une relation similaire à l'équation I.11 (p. 27) :

$$T_2(x) = Nk_m x - Nk_m \delta p_2 \quad (\text{I.18})$$

$$p_2(x) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{k_m \delta (x - x_0)}{k_B T}}}, \quad (\text{I.19})$$

où N désigne le nombre de moteurs impliqués, k_m représente la raideur d'un lien actine-myosine et δ la taille du changement conformationnel conduisant la myosine d'un état à l'autre. A partir de ces mesures, il est possible d'estimer k_m et δ , respectivement $0,25 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ et 8 nm (Huxley et Simmons, 1971). Plus récemment, il est apparu, à travers différentes expériences concordantes (Goldman et Huxley, 1994), que cette valeur de la raideur d'un lien actine-myosine est sous-estimée, notamment parce que le raisonnement conduisant à ces estimations ne prend pas en compte la raideur finie des filaments fins. On considère aujourd'hui, de manière plus réaliste, que $k_m \simeq 2 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ (Huxley et Tideswell, 1996). Il est de toute façon impressionnant, à la lumière des connaissances actuelles, de constater le génie précurseur contenu dans l'interprétation de ces mesures globales sur des fibres musculaires !

Un raisonnement de nature énergétique conduit à une estimation voisine, quoiqu'encore légèrement plus élevée, de la raideur k_m (Howard, 2001) : l'énergie mécanique maximale w_{\max} fournie par moteur et par molécule d'ATP hydrolysée, obtenue lors d'une contraction isométrique, est liée à la taille du pas d'un moteur δ et à la raideur du lien moteur-actine par k_m par

$$w_{\max} = \frac{1}{2}k_m\delta^2.$$

Les expériences de molécule unique indiquent que $\delta = 5$ nm, et des mesures sur des muscles en contraction isométrique donnent $w_{\max} = 60$ pN · nm, c'est-à-dire environ la moitié de l'énergie libre délivrée par l'hydrolyse de l'ATP dans les conditions cellulaires ; on obtient alors $k_m = 5$ pN · nm⁻¹.

1.4 Activation partielle des muscles

Il est possible d'activer une fibre musculaire en utilisant des concentrations de calcium intermédiaires ($\text{pCa} \simeq 5,5-6,5$) entre l'état relaxé et l'état totalement activé du muscle. Dans ces conditions, l'activation est partielle, c'est-à-dire que la tension développée n'est qu'une fraction de la tension maximale obtenue en activation totale I.24(a).

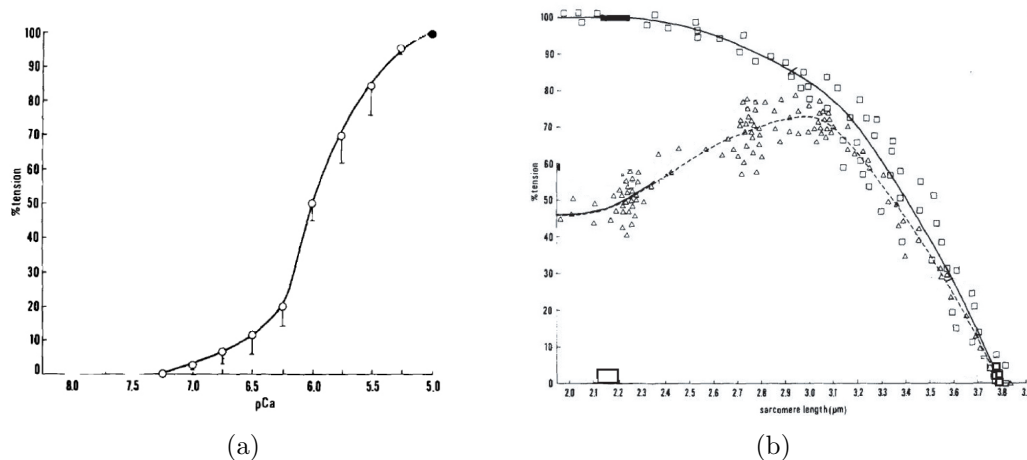


FIG. I.24: **Activation partielle d'une fibre musculaire**

(a) La tension développée par une fibre musculaire du muscle cardiaque de la grenouille dépend de la concentration en calcium de manière sigmoïdale. La tension atteint 50 % de sa valeur maximale pour $\text{pCa}=6$.

(b) Mesure de la tension isométrique sur le même type de fibre à différentes longueurs de sarcomères. Carrés : tension active générée par des fibres complètement activées. La force décroît continuellement lorsque la longueur moyenne des sarcomères augmente. Triangles : Même expériences avec des fibres partiellement activées par le calcium : la courbe est non monotone. Entre 2,3 et 3 μm la tension augmente avec la longueur des sarcomères. Au-delà, la courbe devient décroissante. (a) et (b) : adapté de (Fabiato et Fabiato, 1978).

Nous avons vu précédemment que pour une fibre totalement activée, la tension isométrique décroît linéairement quand la longueur des sarcomères augmente (*cf* p. 30 et Fig. I.20(b)). Lorsque l'activation par le calcium est seulement partielle, la fibre a un comportement qualitativement différent : dans un domaine intermédiaire de longueur de sarcomères (typiquement entre 2 et 3 μm), la force augmente lorsque la longueur moyenne des sarcomères augmente (Endo, 1972; Fabiato et Fabiato, 1978). Au-delà, la courbe force-longueur de sarcomères redevient décroissante (Fig. I.24(b)).¹³

Il est également possible d'activer la contraction d'une fibre musculaire et son activité ATPasique en augmentant la concentration en ADP. Cet effet se produit aussi bien en présence (Cooke et Pate, 1985) qu'en l'absence d'activation par le calcium (Shimizu et coll., 1992) et traduit probablement une augmentation coopérative de l'affinité de la myosine liée à l'ADP pour l'actine décorée par le complexe troponine-tropomyosine. Comme dans le cas des fibres partiellement activées par le calcium, les fibres partiellement activées par l'ADP présentent une relation entre la tension et la longueur des sarcomères non monotone (Shimamoto et coll., 2007).

L'observation que la tension développée, sous condition d'activation partielle de la fibre, augmente lorsqu'on étire les sarcomères s'accomode mal d'un mécanisme de contraction musculaire dans lequel les myosines agissent de manière indépendante. Il a été proposé un modèle phénoménologique (Ishiwata et coll., 2007) impliquant à la fois une diminution de l'espacement entre les filaments lorsque les sarcomères sont étirés (par un simple effet géométrique si les sarcomères ont un volume constant) et un effet coopératif des moteurs par lequel l'accrochage de moteurs liés à l'ADP entraînerait une diminution de la raideur du filament d'actine, et donc une augmentation de l'amplitude de ses fluctuations. Ces deux effets combinés permettraient de recruter un plus grand nombre de moteurs pour interagir avec l'actine et de produire une force plus importante lorsque les sarcomères sont étirés.

Ce mécanisme pourrait également être impliqué dans la propriété d'activation par l'étirement, observée dans tous les types de muscles. Lorsqu'on applique un échelon de longueur à une fibre, étirant les sarcomères, la tension induite développée par la fibre augmente après une phase transitoire de relaxation (Pringle, 1978). Dans les muscles fibrillaires d'insecte et les muscles cardiaques, la tension est maintenue à cette valeur plus importante, et ne relaxe pas vers la tension initiale. Dans les muscles squelettiques, le phénomène est seulement transitoire (Fig. I.25).

¹³Les relations force-longueur dont il est question sont issues de mesures de la force produite par une fibre musculaire à l'état stationnaire sous différentes conditions. Elles sondent des propriétés différentes des relations force-déplacement exposées au paragraphe 1.3 qui concernent le régime transitoire de réponse d'une fibre à une stimulation mécanique.

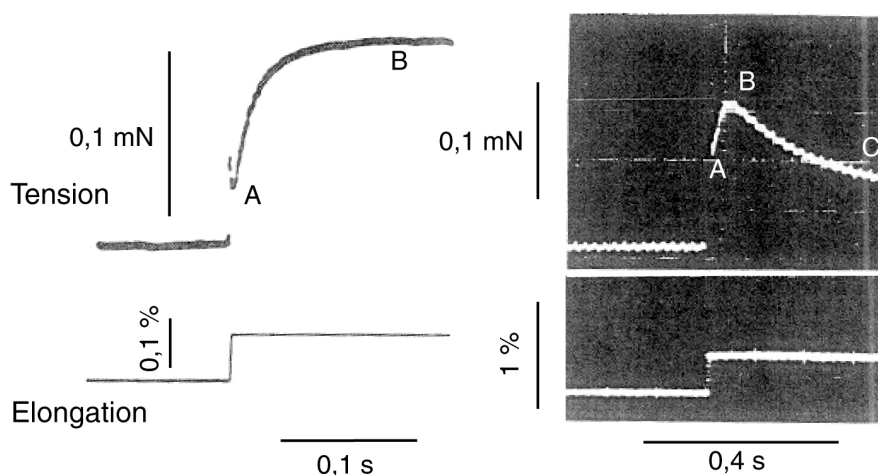


FIG. I.25: **Activation des muscles par l'étirement**

En réponse à un allongement abrupt, la tension développée par un muscle de vol d'insecte (à gauche), après une phase transitoire de relaxation (A), atteint une valeur stationnaire plus élevée que la valeur initiale de la tension (B). Dans les muscles squelettiques de lapin (à droite), le même phénomène se manifeste, mais pas de manière permanente : aux temps longs la tension décroît (C) pour revenir à la valeur initiale (non montré sur la figure) Adapté de (Pringle, 1978).

2 Myosine 1c et mécanosensibilité des cellules ciliées de l'oreille interne

2.1 Transduction mécano-électrique dans l'oreille interne des vertébrés

Nous allons dans ce paragraphe décrire brièvement le processus de la transduction de stimuli mécaniques en signaux nerveux par les cellules ciliées de l'oreille interne. Une description très détaillée est donnée dans d'autres ouvrages (Tinevez, 2006; Martin, 2008).

Les cellules ciliées sont, dans l'oreille interne des vertébrés, le siège de la transduction des stimuli mécaniques en signaux nerveux. Ce sont des cellules épithéliales cylindriques, dont le corps a un rayon de quelques μm et une longueur de quelques dizaines de μm (Fig. I.26(a)). Elles sont dotées à leur sommet d'une touffe ciliaire, organelle spécialisée qui joue le rôle d'antenne mécano-réceptrice. La touffe ciliaire est constituée de stéréocils, structures rigides cylindriques renfermant un faisceau parallèle de filaments d'actine. Les stéréocils sont organisés en rangées de taille croissante, ce qui donne une orientation, ainsi qu'un plan de symétrie, le long de cette direction et parallèlement aux stéréocils, à la touffe ciliaire (Fig. I.26(c)). En plus d'autres liens latéraux situés à la base des cils, le sommet de chaque stéréocil est relié par un lien oblique au flanc du stéréocil le plus proche de la rangée suivante. De tels liens n'existent pas entre stéréocils de même taille. La rangée de cils les plus longs peut dans certains cas être accolée à un kinocil, constitué de microtubules, surmonté par un bulbe d'environ $0,5 \mu\text{m}$ de diamètre (visible sur la fig. I.26). Le kinocil ne semble pas nécessaire à la mécanotransduction ; il jouerait plutôt un rôle

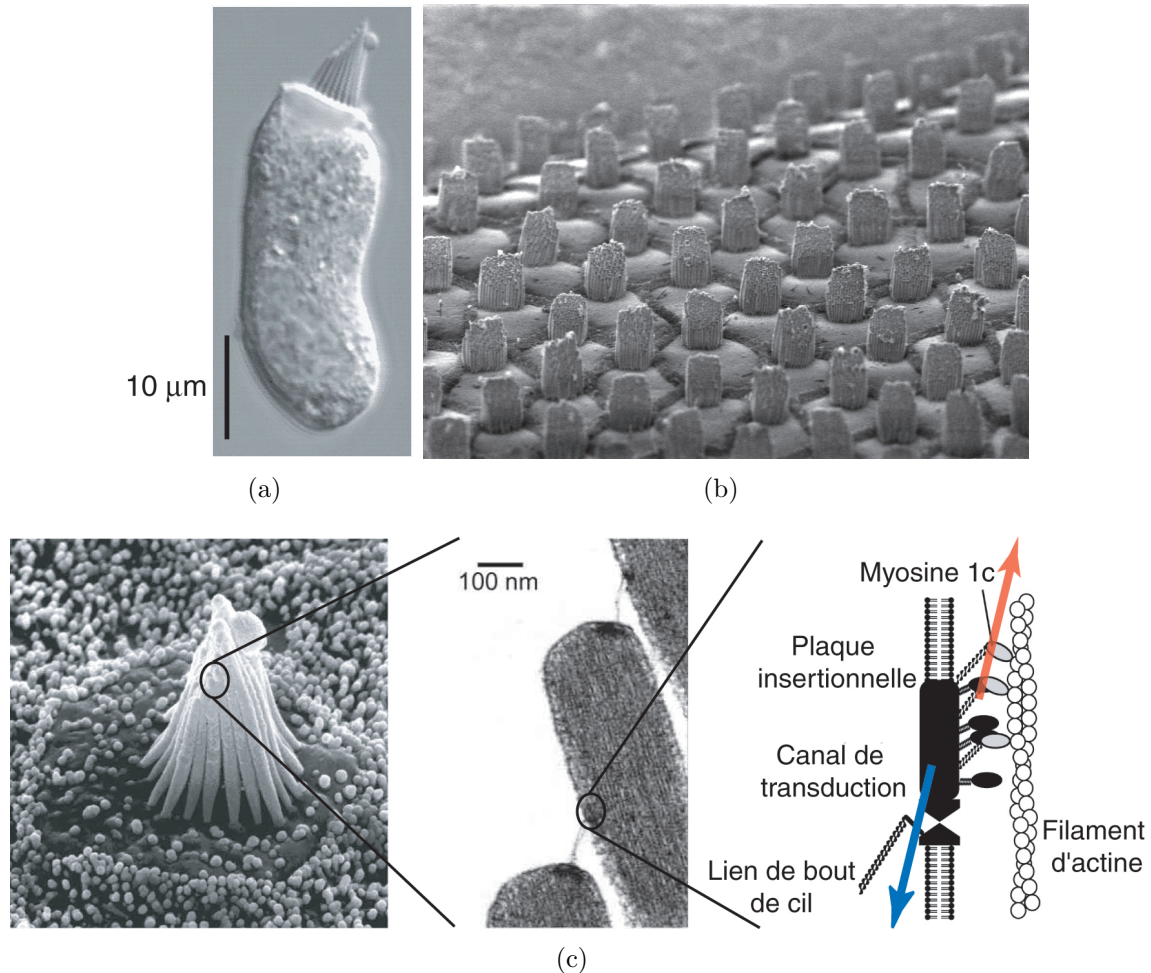


FIG. I.26: **Morphologie des cellules ciliées**

(a) Cellule ciliée entière isolée du saccule de la grenouille taureau, observée en microscopie en contraste de Nomarski (source : A.J.Hudspeth)

(b) Epithélium auditif de poulet, vu en microscopie électronique. On voit de nombreuses touffes ciliaires émergent de l'épithélium. (source : P.G. Gillespie)

(c) Vue agrandie, en microscopie électronique, de la touffe ciliaire d'une cellule ciliée de la grenouille taureau, montrant l'arrangement "en orgue" des stéréocils. Un autre cliché à plus grande échelle permet d'observer les liens de bouts de cil entre les différentes rangées de stéréocils. Ces liens sont connectés au complexe de transduction dans chaque stéréocil : des moteurs moléculaires (myosines 1c) interagissent avec les filaments d'actine et exercent une force sur le complexe en direction du sommet des stéréocils (flèche rouge). Au repos, cette force est contrebalancée par la tension dans le ressort de transduction, de nature inconnue (flèche bleue), qui détermine la probabilité d'ouverture d'un canal mécanosensible.

au cours du développement de la touffe ciliaire.

In vivo, les cellules ciliées sont enchâssées dans un épithélium d'où émergent les touffes ciliaires (Fig. I.26(b)). Ces dernières baignent dans un fluide où se propagent les stimuli mécaniques, amenés depuis l'extérieur par le reste de l'appareil auditif en amont. A cause des liens entre cils, un stimulus mécanique provoque une déflexion en bloc de la touffe ciliaire. Une déflexion dans le sens des rangées de taille croissante, qu'on dénommera positive par convention, provoque l'ouverture de canaux ioniques dans la membrane des stéréocils. Le courant de transduction provoqué par l'afflux de cations dans la touffe ciliaire initie une cascade de signalisation qui commence par la dépolarisation de la cellule entière et aboutit à la libération de neurotransmetteurs au niveau d'une synapse afférente à la base du corps cellulaire.

La transduction des stimuli mécaniques est très rapide : l'homme est capable d'entendre des sons jusqu'à 20 kHz. La limite est encore supérieure chez d'autres espèces comme la chauve-souris ou la baleine. Par comparaison, les cellules photoréceptrices de l'œil ne répondent qu'avec une constante de temps d'une centaine de millisecondes. Une telle rapidité suggère que les canaux ioniques de la touffe ciliaire sont directement activés par le stimulus mécanique, sans faire appel à un mécanisme mettant en jeu un second messager de nature biochimique. Dans le cadre du modèle du ressort de transduction¹⁴ (Corey et Hudspeth, 1983; Martin, 2008), la probabilité d'ouverture du canal de transduction est directement contrôlée par la tension dans un élément élastique qui lui est lié (Fig. I.26(c)). Lorsque la tension est nulle ou faible, tous les canaux sont fermés. Une augmentation de tension due à une stimulation positive favorise l'état ouvert des canaux. A ce jour ni la nature moléculaire du canal de transduction, ni celle du ressort de transduction ne sont connues.

La probabilité d'ouverture des canaux au repos, dans une cellule isolée, n'est pas nulle (Corey et Hudspeth, 1983). La tension au repos dans le ressort de transduction doit donc être suffisante pour maintenir une fraction non négligeable des canaux ouverts. Cela suggère l'existence d'un mécanisme actif capable de maintenir une telle tension. Il a été proposé que la tension du ressort de transduction est imposée par un moteur myosine qui ancrerait le complexe de transduction aux filaments d'actine qui emplissent chaque stéréocil (Schéma, Fig. I.26(c)) (Hudspeth et Gillespie, 1994). La tension dans chaque lien ressort étant d'environ 14 pN (Martin, 2008), on estime le nombre de myosines à 50-150 par complexe de transduction.

2.2 Une myosine comme moteur d'adaptation dans les cellules ciliées de l'oreille interne des vertébrés

Comme tous les systèmes sensoriels, les cellules ciliées possèdent un mécanisme d'adaptation, qui leur permet de rester sensibles aux petits stimuli transitoires même en présence d'un stimulus statique saturant. Par exemple, nous sommes sensibles aux accélérations causées par les mouvements de notre tête, mais nous ne sentons pas le champ gravitationnel terrestre. Au niveau de la touffe ciliaire, l'adaptation se manifeste dans le courant de transduction engendré par une marche de déplacement

¹⁴“gating spring”

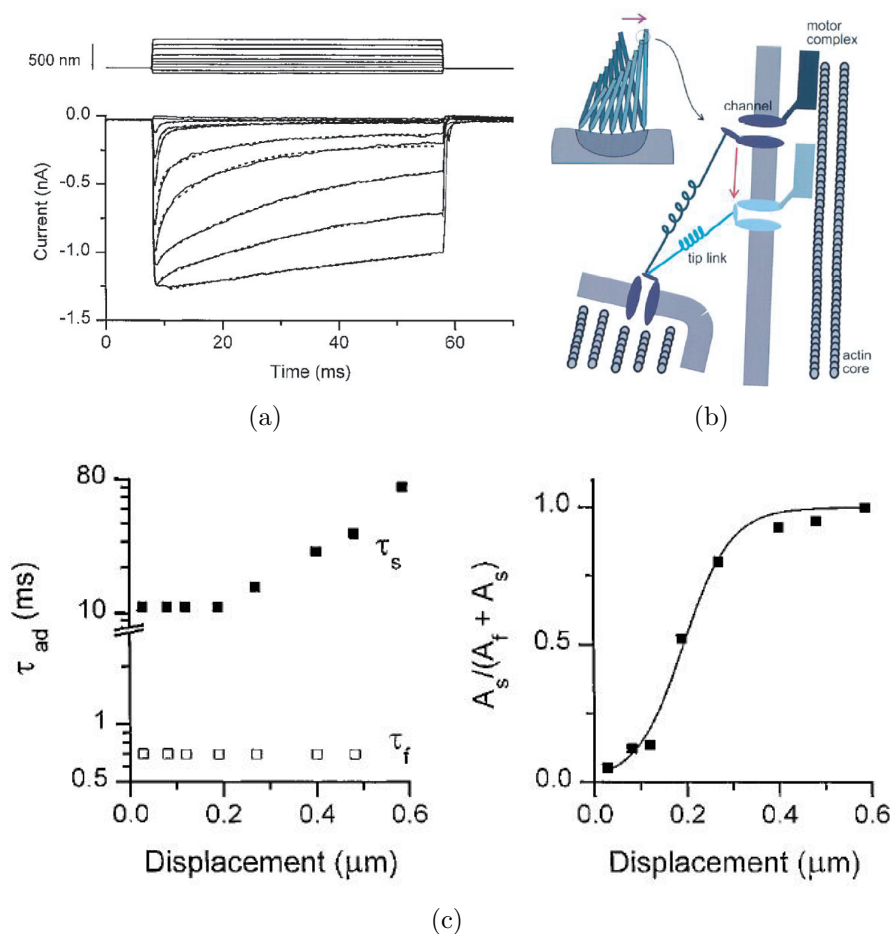


FIG. I.27: **Phénomène d'adaptation dans les touffes ciliaires**

(a) Courant de transduction (en bas) dans une cellule ciliée de tortue, en réponse à une série d'échelons de déplacements (en haut) maintenus sur une longue durée. Après qu'elle a atteint son maximum, la décroissance du courant est ajustée par une fonction bi-exponentielle, pour produire les résultats présentés en (c). Extrait de (Wu et coll., 1999).

(b) Schéma de principe de l'adaptation positive, dans le cadre du modèle du ressort de transduction. Après une déflexion positive, l'excès de tension dans l'élément élastique est relaxé lorsque le canal glisse vers le bas du stéréocil, ce qui permet sa refermeture. Les auteurs (Gillespie et Corey, 1997) identifient ici, de manière arbitraire, le lien de bout de cil au ressort de transduction.

(c) A gauche : constantes de temps lente τ_s et rapide τ_f issues des ajustements effectués en (a). A droite : rapport de l'amplitude de l'exponentielle lente et de la somme des amplitudes des deux exponentielles. Ce rapport détermine la fraction de l'adaptation due à la phase lente.

imposée à la touffe. En réponse à des déflexions positives, le courant augmente tout d'abord rapidement (en valeur absolue), reflétant l'ouverture des canaux, puis décroît en direction de sa valeur initiale, ce qui indique une refermeture plus lente des canaux (Fig. I.27(a)). L'adaptation est complète pour les petites déflexions ; pour les grands stimuli, le courant ne revient pas même aux temps longs à sa valeur initiale, ce qui indique une adaptation incomplète. L'adaptation se traduit par un glissement

de la courbe courant/déplacement de la touffe ciliaire selon l'axe de déplacement dans la direction du stimulus statique imposé, sans déformation de la courbe (Eatock et coll., 1987). Le rôle de l'adaptation est donc de ramener la probabilité d'ouverture des canaux à sa valeur au repos, restaurant ainsi la sensibilité de la touffe ciliaire aux stimuli transitoires.

La cinétique de l'adaptation est complexe. Deux constantes de temps sont impliquées dans la dynamique du courant de transduction. En fonction des espèces, la constante de temps rapide varie entre quelques dizaines de microsecondes pour le rat à quelques millisecondes pour la grenouille. La constante de temps la plus lente varie de 10 à 100 ms. Pour les faibles déplacements, la phase rapide assure à elle seule la quasi-totalité de l'adaptation. Inversement, pour les plus grands déplacements, elle n'intervient pratiquement pas (Fig. I.27(c)).

Selon le modèle du ressort de transduction, l'ouverture des canaux en réponse à un stimulus positif est due à une augmentation de la tension dans l'élément élastique couplé à chaque canal. Le phénomène d'adaptation pourrait être expliqué s'il existe un mécanisme qui relâche la tension dans les ressorts de transduction en présence d'un stimulus statique positif, entraînant la refermeture des canaux, et inversement qui augmenterait cette tension dans le cas d'un stimulus négatif. Un tel mécanisme d'ajustement de la tension pourrait venir d'un glissement du complexe de transduction le long du stéréocil (Fig. I.27(b)). Ceci requiert l'activité d'un moteur moléculaire, capable de produire du travail mécanique à partir d'énergie biochimique.

De nombreuses données indiquent que la myosine 1c est impliquée dans l'adaptation, au moins pour les cellules ciliées du saccule de la grenouille et de l'utricule de la souris (Gillespie et Cyr, 2004). En particulier, des expériences récentes mêlant génie génétique sur la myosine 1c et électrophysiologie ont montré que la myosine 1c est nécessaire pour l'adaptation (Stauffer et coll., 2005). Des simulations numériques, utilisant un modèle basé sur l'existence d'un ressort de transduction pour déterminer la probabilité d'ouverture du canal et sur l'activité de moteurs moléculaires, régulée par le calcium, suggèrent également que l'adaptation résulterait d'un seul mécanisme lié aux moteurs (Tinevez et coll., 2007). Dans cette description, la probabilité d'ouverture des canaux de transduction au repos ainsi que l'évolution temporelle (adaptation) de cette probabilité en réponse à un stimulus statique sont sous contrôle d'un même groupe de moteurs moléculaires de type myosine. Un autre mode de fonctionnement a été proposé (Wu et coll., 1999). Dans celui-ci, l'état des canaux au repos est toujours imposé par la tension dans les liens de bout de cil exercée par un moteur, mais l'adaptation, du moins sa composante rapide, proviendrait, elle, de l'interaction de la composante calcique du courant de transduction avec les canaux, favorisant la fermeture de ceux-ci.

2.3 Courbe force-déplacement d'une touffe ciliaire

En imposant des marches de déplacement à une touffe ciliaire, et en mesurant la force nécessaire pour maintenir un tel déplacement, il est possible d'obtenir la relation force-déplacement de la touffe ciliaire (Martin et coll., 2000). Ces mesures

sont effectuées à temps court (~ 3 ms après application de la marche), ce qui permet de supposer que l'adaptation au stimulus statique n'a pas eu le temps de se développer de manière significative et que l'on estime au mieux les propriétés élastiques de la touffe. Aux grands déplacements positifs et négatifs, la courbe est linéaire, ce qui correspond au comportement d'un ressort simple. Au voisinage de la position de la touffe au repos, la pente de la courbe est de signe opposé. La relation force-déplacement est donc globalement non linéaire et présente une zone de raideur négative (Fig. I.28). Cette région est mécaniquement instable et définit une gamme

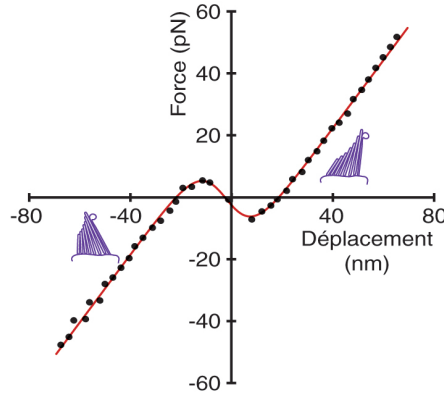


FIG. I.28: **Courbe force-déplacement d'une touffe ciliaire**

La relation force-déplacement aux temps courts d'une touffe ciliaire est non linéaire. La raideur dépend de la position imposée à la touffe et peut devenir négative. La zone de raideur négative est mécaniquement instable.

de positions où la touffe ciliaire ne peut résider à l'état stationnaire.

L'existence d'une région de raideur négative dans la relation force-déplacement de la touffe ciliaire s'interprète aisément comme une conséquence de l'assouplissement dû à l'ouverture du canal de transduction mécanosensible en réponse à une déflexion positive, que nous avons discuté en détail précédemment (p. 27). Remarquons que ce modèle est très similaire à l'interprétation de la non-linéarité de la courbe T_2 obtenue dans les muscles (Huxley et Simmons, 1971, et *cf* p. 37). Conformément à l'équation I.12, la raideur apparente d'un ensemble canal-ressort de transduction dépend de l'extension x du ressort, via la probabilité d'ouverture du canal P_o :

$$\bar{k} = k - \frac{(k\delta)^2}{k_B T} P_o (1 - P_o). \quad (\text{I.20})$$

Le comportement non monotone de la relation force-déplacement correspond à un régime où l'assouplissement non linéaire dû à l'existence de deux états stables du canal séparés par un changement conformationnel δ , est suffisamment important pour surpasser la raideur mécanique k , et rendre la raideur effective \bar{k} négative.

En raison de la configuration géométrique de la touffe ciliaire, il existe un facteur d'amplification, qui vaut ~ 7 pour les touffes ciliaires du saccule de la grenouille taureau, entre l'extension x du ressort de transduction et le déplacement X de la

touffe ciliaire, mesuré figure I.28. En prenant en compte ce facteur, il est possible à partir de la relation force-déplacement de la touffe ciliaire d'estimer la valeur de la raideur du ressort de transduction et la taille du changement conformationnel associé à l'ouverture du canal. Pour le saccule de la grenouille taureau, on obtient respectivement $k = 0,57 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ et $\delta = 8,2 \text{ nm}$ (Martin et coll., 2000).

3 Oscillations spontanées du système acto-myosine

Le choix des fibres musculaires et des touffes ciliaires comme exemples de systèmes physiologiques tirant profit de l'action de moteurs moléculaires n'est pas dû au hasard. Outre le fait d'impliquer dans leur fonctionnement, au niveau moléculaire, une assemblée de myosines, ces deux systèmes partagent également l'étonnante propriété, sous certaines conditions, d'osciller spontanément. Dans les deux cas, il existe de sérieuses présomptions quant au rôle actif des myosines dans ces oscillations.

3.1 Oscillations mécaniques spontanées des fibres musculaires

Chez certains insectes, les muscles contrôlant le battement des ailes sont asynchrones, c'est-à-dire qu'ils oscillent mécaniquement avec un rythme non corrélé aux influx nerveux qu'ils reçoivent (Pringle, 1978). L'activité oscillatoire est liée à la propriété d'activation par étirement, que nous avons mentionnée plus haut. Des oscillations mécaniques spontanées régulières ont été aussi observées sur les muscles cardiaques (Fabiato et Fabiato, 1978; Linke et coll., 1993; Fukuda et coll., 1996) et squelettiques (Okamura et Ishiwata, 1988). L'utilité physiologique du comportement oscillatoire des muscles asynchrones d'insectes est évidente. Il a été récemment suggéré que les oscillations spontanées jouent également un rôle physiologique dans les muscles cardiaques (Ishiwata et coll., 2007). En revanche, les circonstances dans lesquelles les muscles squelettiques oscillent ne correspondent pas aux conditions physiologiques dans lesquelles ils opèrent. Des oscillations transitoires ont également été rapportées dans des fibres de muscle squelettique en réponse à des échelons de longueur (Armstrong et coll., 1966), ou à des échelons de force (Fig. I.37) (Edman, 1988; Edman et Curtin, 2001).

In vitro, le comportement oscillatoire de fibres musculaires se manifeste par des oscillations spontanées de la tension développée dans des conditions isométriques (Fig. I.29(a)), et par des oscillations contractiles spontanées des sarcomères (Fig. I.29(b)). Ces oscillations sont caractérisées par une période de quelques secondes et une forme triangulaire asymétrique, avec une phase lente dans le sens de l'activité mécanique naturelle des moteurs et une phase rapide dans la direction opposée.

L'observation d'oscillations spontanées dans une fibre musculaire cardiaque ou squelettique est conditionnée à la réunion des conditions suivantes :

1. La fibre doit être partiellement activée soit par le calcium (Fabiato et Fabiato, 1978) soit par l'ADP (Okamura et Ishiwata, 1988).¹⁵ La nécessité d'une acti-

¹⁵L'étude systématique du comportement de fibres musculaires cardiaques en faisant varier la concentration de phosphate inorganique, de calcium, et d'ADP, a permis de construire un dia-

vation de la fibre montre que les oscillations sont liées à l'activité des myosines.

2. La longueur moyenne des sarcomères doit être inférieure à $3\ \mu\text{m}$.
3. La fibre doit être soumise à une charge : aucune oscillation n'est observée *in vitro* sur des fibres flottant librement en solution.

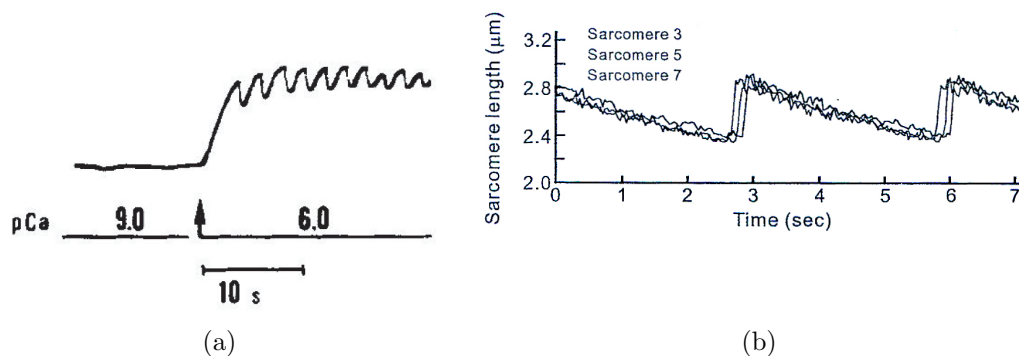


FIG. 1.29: **Oscillations mécaniques de fibres musculaires**

(a) Oscillations de tension isométrique d'une fibre cardiaque de rat sous activation partielle par le calcium. Le changement de concentration en calcium est indiqué par la flèche. L'activation de la fibre entraîne une augmentation de la tension, qui devient oscillante autour de sa nouvelle valeur moyenne. Extrait de (Fabiato et Fabiato, 1978).

(b) Longueur de trois sarcomères en fonction du temps dans une myofibrille de muscle squelettique de lapin tenue entre deux tiges de verre flexibles présentant des oscillations contractiles. La forme des oscillations montre une forme triangulaire caractéristique. Extrait de (Ishiwata et coll., 2007)

Ces conditions d'observation sont identiques à celles dans lesquelles la relation entre la tension et la longueur des sarcomères est non monotone (*cf supra* p. 39 et fig. I.24(b)). La gamme de longueur de sarcomères donnant lieu à un comportement oscillatoire correspond à la zone croissante de cette courbe, suggérant un lien entre les deux propriétés.

Des oscillations du même type ont été obtenues avec des fibres musculaires cardiaques dont les filaments fins, c'est-à-dire l'actine et les protéines régulatrices, ont été supprimés et remplacés par des filaments d'actine nus exogènes (Fujita et Ishiwata, 1998). Dans ce système où l'interaction actine-myosine n'est plus régulée par les protéines associées à l'actine, des oscillations sont observées, uniquement en présence de 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM), une molécule qui interfère – ici par-

gramme tridimensionnel ($\text{pCa-P}_i\text{-ADP}$) des états des fibres (Fukuda et coll., 1996). Outre les régions conventionnelles de contraction et de relaxation, ce diagramme montre que les domaines d'oscillations dues à l'activation partielle par l'ADP d'une part, et par le calcium, d'autre part, sont connectées et ne forment en fait qu'un domaine, correspondant vraisemblablement à un même état du système contractile au niveau moléculaire. Le fait qu'une partie du domaine d'oscillation corresponde à des conditions physiologiques, ainsi que l'observation que les fréquences d'oscillations mesurées sur les fibres musculaires de différentes espèces animales soient du même ordre de grandeur et corrélées linéairement à la fréquence des battements cardiaques chez ces mêmes animaux vivants (Ishiwata et coll., 2007), laissent supposer que l'existence d'un état spontanément oscillant des myofibrilles répond à une utilité physiologique.

tiellement – avec l’activité de la myosine. Ces expériences suggèrent que le mécanisme d’auto-oscillation des myofibrilles provient de propriétés intrinsèques du complexe actine-myosines, indépendamment des protéines régulatrices.

3.2 Les touffes ciliaires oscillent spontanément

Caractéristiques des oscillations

Lorsque une cellule ciliée du saccule de la grenouille est placée *in vitro* dans un environnement ionique imitant les conditions dans lesquelles elle évolue *in vivo*, il a été observé que sa touffe ciliaire oscille spontanément (Martin et Hudspeth, 1999; Martin et coll., 2003). Ces oscillations ont une forme d’oscillation de relaxation rectangulaire : chaque demi-période se compose d’une phase lente dans une direction, interrompue par un saut rapide dans la direction opposée (Fig. I.30(a)). La fréquence

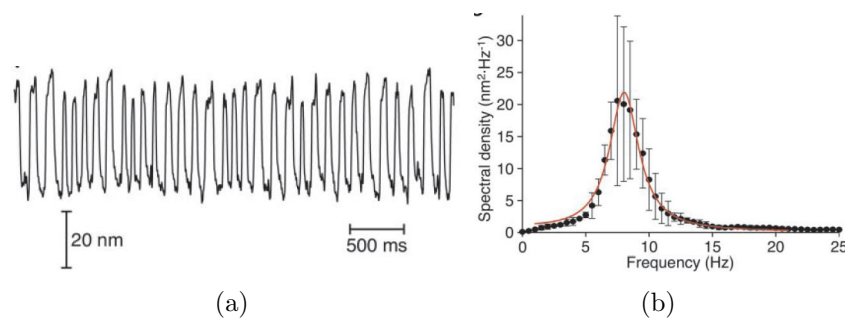


FIG. I.30: **Oscillations spontanées de la touffe ciliaire d’une cellule ciliée de grenouille**

(a) Mouvement d’une fibre de verre flexible attachée au bulbe du kinocil de la touffe ciliaire. L’oscillation, en forme de créneaux, a une amplitude quadratique moyenne de 28 nm.

(b) Le spectre de puissance du signal illustré en (a) est centré sur une fréquence de 8 Hz. Le facteur de qualité de cette oscillation est d’environ 2. Extrait de (Martin et coll., 2001).

se situe typiquement entre 5 et 50 Hz, et l’amplitude pic-à-pic peut atteindre 100 nm. Ces oscillations sont bruitées : le spectre de puissance montre un pic bien défini centré sur une fréquence ν_0 définissant la fréquence caractéristique des oscillations. Les fluctuations de fréquence autour de ν_0 sont caractérisées par un facteur de qualité $Q = \frac{\nu_0}{\Delta\nu} \simeq 1 - 3$, $\Delta\nu$ étant la largeur du spectre à mi-hauteur (Fig. I.30(b)). Le mouvement de la touffe ciliaire perd donc sa cohérence de phase au bout de quelques cycles.

Le comportement oscillatoire d’une cellule disparaît, réversiblement, si la concentration en calcium dans le milieu environnant est inférieure à 100 μM ou supérieure à 1 mM. Entre ces limites, la fréquence de l’oscillation est une fonction croissante de la concentration en calcium. D’autre part, si on accole au bulbe kinociliaire une fibre de verre flexible (Fig. I.30(a)), la fréquence et l’amplitude des oscillations dépendent de la rigidité de la fibre : plus elle est rigide, plus les oscillations sont rapides et de faible amplitude (Martin et coll., 2003). Au-delà d’une rigidité seuil ($\sim 1 \mu\text{N} \cdot \text{nm}^{-1}$) les oscillations disparaissent.

L'étude simultanée du mouvement spontané et de la réponse à des stimulations sinusoïdales d'une touffe ciliaire oscillante a montré que le théorème fluctuation-dissipation, reliant le spectre des fluctuations à la fonction de réponse linéaire pour tout système physique à l'équilibre thermodynamique, est violé au voisinage de la fréquence caractéristique d'oscillation (Martin et coll., 2001). Les oscillations spontanées sont donc dues à un élément actif, consommant de l'énergie, interne à la cellule. Bien qu'elles n'aient pas été directement observées *in vivo*, ces oscillations pourraient être d'utilité physiologique, en améliorant les performances mécano-sensorielles de la cellule (Martin et Hudspeth, 2001).

Modèle de l'oscillation ciliaire

Quel est alors le mécanisme responsable de ces oscillations? Le fait qu'elles mettent en jeu un processus interne à la cellule consommant de l'énergie suggère que les myosines 1c, moteurs de l'adaptation, sont impliquées dans ce mécanisme.

Il existe une correspondance biunivoque entre la relation force-déplacement de la touffe ciliaire et la relation entre la probabilité d'ouverture des canaux et le déplacement de la touffe ciliaire (*cf* p. 27, équation I.11). La présence d'une zone de raideur négative dans la courbe force-déplacement élimine donc une gamme de probabilités d'ouverture, pour lesquelles le système ne pourrait rester stable.

Dans le modèle du ressort de transduction, la probabilité d'ouverture du canal P_o est déterminée par la force que les myosines 1c exercent sur l'élément élastique lié au canal. Pour rendre compte de la régulation par le calcium de la probabilité d'ouverture des canaux au repos et de la cinétique d'adaptation, la force d'arrêt f_a des moteurs est supposée être une fonction décroissante de la concentration en calcium. Dans ces conditions, le système peut osciller spontanément, selon le mécanisme expliqué figure I.31. La méthode la plus simple pour décrire formellement cette dépendance est de poser

$$f_a = f_{\max}(1 - SP_o), \quad (\text{I.21})$$

où S est un paramètre numérique, de l'ordre de 1, déterminant la force de la rétroaction du calcium sur les moteurs. Comme nous l'avons mentionné plus haut, la disparition des oscillations lorsque la concentration en calcium est inférieure à 100 μM ou supérieure à 1 mM indique que, de même que dans les muscles, les oscillations se produisent dans des conditions d'activation partielle des moteurs.

Dans ce modèle la relation force-vitesse des myosines est linéaire et aucune oscillation n'est observée si l'activité des myosines n'est pas régulée par le calcium. Expérimentalement, si les canaux sont bloqués par de la gentamicine, les oscillations cessent et la relation force-déplacement devient linéaire (Martin et coll., 2003).

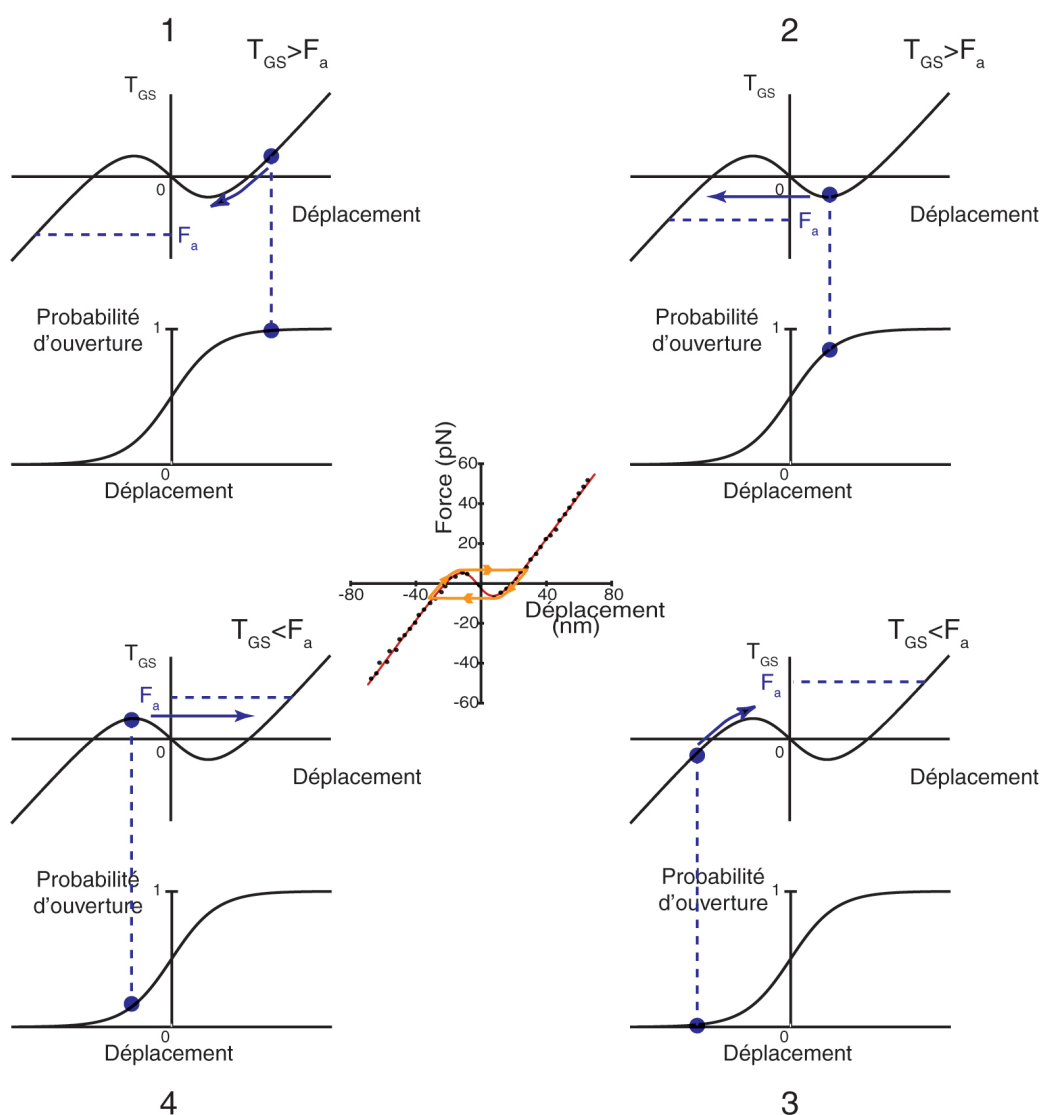


FIG. I.31: **Modèle de l'oscillation spontanée d'une touffe ciliaire**

Dans la situation 1, la touffe est défléchie positivement, la tension T_{GS} dans le ressort de transduction est importante et les canaux sont majoritairement ouverts. La concentration en calcium à proximité des moteurs est donc importante et la force d'arrêt des moteurs est faible. En conséquence, les moteurs ne sont pas au repos et glissent vers le bas des stéréocils pour refermer les canaux. Arrivée à la situation 2, la touffe ciliaire est au bord de la zone instable de raideur négative. Comme les canaux sont davantage fermés, la force d'arrêt a augmenté, mais trop peu pour que les moteurs soient au repos. La touffe ciliaire saute de l'autre côté de la zone instable (situation 3). Dans cette situation, la probabilité d'ouverture est beaucoup plus faible ; les canaux sont majoritairement fermés. A cause de la diminution de la concentration en calcium intracellulaire, la force d'arrêt des moteurs augmente fortement. La situation est symétrique de la configuration 1, et les moteurs grimpent le long des stéréocils pour rouvrir les canaux, jusqu'à la situation 4, où la touffe ciliaire saute de nouveau du côté des déflexions positives. Les oscillations résultent donc du fait qu'à cause de la rétroaction du calcium sur leur force d'arrêt et de la présence d'une zone instable, les moteurs n'atteignent jamais l'équilibre pour lequel $F_a = T_{GS}$ et forcent la touffe ciliaire à effectuer des cycles autour de sa région de raideur négative, comme illustré au centre

3.3 Résumé

Les fibres musculaires et la touffe ciliaire des cellules mécanosensorielles de l'oreille interne sont deux exemples de systèmes oscillants spontanément mettant en jeu des myosines non processives, de nature différente : myosine II dans les muscles, myosine 1c dans les cellules ciliées. Dans les conditions donnant lieu à l'observation d'oscillations, les conditions d'opération des moteurs vérifient les deux critères suivants :

1. En raison de leur caractère non-processif, les myosines travaillent en groupe.
2. Il existe dans le système une force élastique qui s'oppose à la force produite par l'assemblée de moteurs : la charge imposée à la fibre musculaire dans le cas des muscles, la tension dans le ressort de transduction dans le cas des touffes ciliaires.

E Une échelle intermédiaire : effets collectifs dans les systèmes de moteurs

1 Indications d'effets collectifs dans les muscles

La réduction d'un système complexe à ses constituants élémentaires pour comprendre son fonctionnement, n'est valable que si ces éléments, lorsqu'ils sont présents en grand nombre, opèrent indépendamment les uns des autres. Cette démarche a implicitement présidé à l'évolution de la recherche, sur les dernières décennies, dans son cheminement des fibres musculaires contenant plusieurs millions de moteurs aux expériences *in vitro* à un seul moteur. Cependant, un certain nombre d'observations dans les muscles ne trouvent pas d'explication, même avec la connaissance la plus détaillée du cycle mécano-chimique d'un moteur individuel :

1. Lorsqu'elle est complètement activée, que ce soit par le calcium ou par l'ADP, une myofibrille produit une force proportionnelle au nombre de moteurs impliqués : la tension produite par la contraction (isométrique) de la fibre à l'état stationnaire décroît avec la longueur des sarcomères. Dans des conditions d'activation partielle, en revanche, le comportement est très différent : il existe un domaine de longueurs de sarcomères pour lesquels la tension isométrique développée par la fibre augmente quand la longueur moyenne des sarcomères augmente, c'est-à-dire quand le nombre de moteurs susceptibles d'interagir avec l'actine diminue.
2. L'existence d'un état d'oscillation spontanée de tension et de longueur des sarcomères semble être une propriété générale de tous les types de muscles, lorsqu'ils sont soumis à une charge mécanique, et pour certaines compositions de leur environnement chimique. Ces compositions correspondent à celles dans lesquelles la relation force-longueur des sarcomères est non monotone.
3. La relation force-vitesse des fibres musculaires est correctement décrite par les modèles de générateurs de force indépendants (Huxley, 1957) dans le domaine

des petites forces qui prédisent une relation hyperbolique. A proximité de la force isométrique, et pour des vitesses négatives, elle s'écarte de ce comportement. C'est justement lorsqu'on force les fibres musculaires à opérer près des conditions isométriques, là où la relation force-vitesse est "anormale", qu'elles oscillent spontanément. Par exemple, pendant les mesures de contraction isotonique nécessaires à l'obtention des courbes force-vitesse, il arrive que la fibre oscille spontanément pendant la phase de contraction (Fig. I.37), uniquement lorsque la force imposée est proche de la force isométrique (Edman, 1988; Edman et Curtin, 2001).

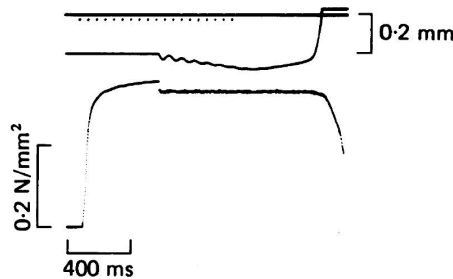


FIG. I.32: **Oscillations d'une fibre pendant sa contraction isotonique**

La fibre est au départ en contraction isométrique. La charge est ensuite diminuée à 90% de la force isométrique (signal inférieur), ce qui induit une contraction de la fibre à vitesse constante (signal du milieu), à laquelle se superposent des oscillations de la longueur de la fibre. Extrait de (Edman, 1988).

Ces observations semblent donc être différentes manifestations de l'existence de propriétés nouvelles, liées à l'action collective des myosines, dont il ne peut être rendu compte uniquement à partir des caractéristiques de moteurs individuels.

2 Un exemple de propriété collective en biophysique

L'existence de phénomènes collectifs, c'est-à-dire, pour tirer parti de la concision de la langue anglaise, la notion de "more is different"¹⁶, est bien connue en physique. Il est notamment établi que de tels effets sont à l'origine de toutes les transitions de phase, que les interactions entre électrons dans les solides cristallins donnent lieu à l'apparition d'états électroniques nouveaux... La communauté des biologistes est, par nature, moins familière avec ce genre de phénomènes. Bien que hors d'équilibre, car actifs, les systèmes biologiques peuvent néanmoins présenter des transitions dynamiques de comportement, analogues aux transitions de phase statiques pour des systèmes à l'équilibre thermodynamique.

Le mouvement de microtubules généré par le moteur NK11 en est une belle illustration (Endow et Higuchi, 2000) : le NK11 est un moteur moléculaire obtenu par la mutation d'un acide aminé du moteur Ncd, moteur de la famille des kinésines

¹⁶(Duke, 2002)

interagissant de manière processive avec les microtubules. Les tests de motilité *in vitro* montrent que NK11 est capable de faire avancer les microtubules dans les deux directions, avec des vitesses comparables (de l'ordre de $14 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$). Un même microtubule peut avancer dans un sens sur des distances de plusieurs dizaines de microns, puis brutalement inverser le sens de son mouvement. En revanche, des expériences effectuées avec des moteurs accrochés de manière éparse sur des billes montrent qu'une molécule individuelle de NK11 est non processive, et que les interactions mécaniques individuelles avec un microtubule donnent lieu, de manière apparemment aléatoire, à des déplacements de quelques nanomètres dans l'une ou l'autre direction.

Ainsi, une molécule individuelle est incapable de déplacer un microtubule de manière directionnelle, alors qu'un groupe de ces mêmes moteurs peut le faire avancer dans l'une ou l'autre direction : si un certain nombre de moteurs tirent dans un sens, ils augmentent la probabilité, initialement distribuée aléatoirement, que les autres moteurs se mettent à tirer dans la même direction. En ce sens, la bidirectionnalité observée en test de motilité est bien une manifestation de l'action collective des moteurs.

Un mouvement bidirectionnel *in vitro* a également été observé pour des filaments d'actine se déplaçant sur un tapis de myosines II, mais à la condition qu'une force constante soit appliquée sur les filaments d'actine, chargés négativement, à l'aide d'un champ électrique (Fig. I.33 (Riveline et coll., 1998)).

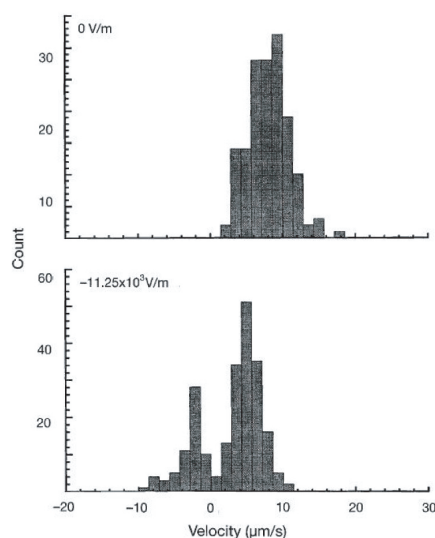


FIG. I.33: **Mouvement bidirectionnel de filaments d'actine en “test de motilité électrique”**

En l'absence de champ électrique, les vitesses des filaments sont positives et leur distribution est centrée autour d'une valeur moyenne de $7 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ environ. Lorsqu'un champ électrique de $11 \text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ s'opposant au mouvement généré par les moteurs est appliqué, l'histogramme des vitesses devient bimodal; les vitesses des filaments se déplaçant dans la direction positive sont plus faibles qu'en l'absence de champ, et certains filaments se déplacent dans la direction négative.

3 Approches théoriques du comportement collectif de moteurs moléculaires

Différents modèles ont été proposés pour décrire le comportement collectif de moteurs moléculaires. Nous allons dans cette section exposer brièvement le principe de ces modèles.

3.1 Taux de transition dépendants de la force

Un modèle de la dynamique des sarcomères a été proposé, dont les deux caractéristiques essentielles sont les suivantes (Duke, 1999) :

- Il existe essentiellement trois états possibles pour les myosines : un état détaché et deux états attachés A1 et A2 (typiquement un état ADP- P_i et un état ADP). Le passage de A1 à A2 s'accompagne de la libération de P_i , et d'un changement conformationnel dans la tête de la myosine amplifié par le bras de levier en un mouvement d de 5 à 10 nm de l'extrémité du domaine régulateur. En conséquence, le taux de transition entre les deux états, ainsi que le rapport des probabilités d'occupation des deux états, sont dépendants de la force appliquée au moteur (comme nous l'avons détaillé au chapitre 1). Une force opposée au mouvement du moteur tend à empêcher la production du coup de force conduisant de A1 à A2, tandis qu'une force dans le sens du moteur favorise cette étape. La transition accompagnant la libération d'ADP et conduisant à l'état rigor où la myosine peut se détacher rapidement en se liant à un ATP est elle aussi dépendante de la force, ce qui conduit à augmenter le nombre de moteurs liés au filament lorsque les moteurs sont soumis à une force importante s'opposant à leur mouvement.
- La production du coup de force donne lieu à une compétition entre la diminution d'enthalpie libre ΔG liée au changement d'état chimique de la myosine et l'augmentation d'énergie élastique $1/2Kd^2$ dans la molécule liée au changement conformationnel. L'efficacité des moteurs est optimale si $\epsilon_1 = 1/2Kd^2/\Delta G > 1$, ce qui signifie que pour une myosine isolée, le coup de force est énergétiquement défavorisé. La production du coup de force devient probable si, sous l'effet d'autres myosines, le filament est déplacé dans le sens du changement conformationnel, ce qui diminue l'augmentation d'énergie élastique. En ce sens, l'action des myosines dans les muscles est par essence coopérative.

Ce modèle permet d'obtenir une relation force-vitesse d'un sarcomère qui reproduise celle d'une fibre musculaire mesurée par (Edman, 1988). En dépit du caractère stochastique du modèle, la dépendance en force des taux de transition et la nécessité de coopérativité peut entraîner une synchronisation des coups de force d'un grand nombre de moteurs. Dans des conditions de contraction isométrique, avec une charge proche de la tension isométrique, le modèle montre également qu'un filament fin a un mouvement en forme de marches, produisant des oscillations triangulaires autour du mouvement moyen de contraction à vitesse constante (Fig. I.34)(Duke, 1999). Ce mouvement oscillatoire est triangulaire, avec une phase rapide dans le sens du mouvement des moteurs, et lente dans le sens opposé. Remarquons que ce comportement

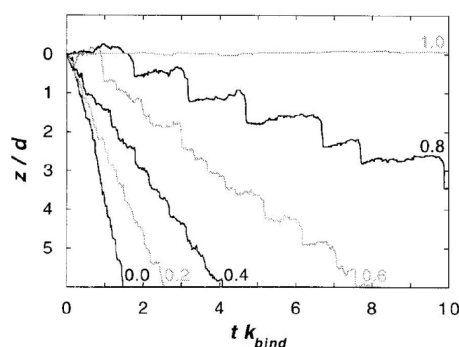


FIG. I.34: **Oscillation d'un filament fin dans des conditions de contraction isométrique**

Au mouvement moyen de contraction se superpose un mouvement oscillant avec une forme triangulaire : la synchronisation des coups de force des myosines produit un déplacement abrupt d'amplitude d dans la direction de la contraction, puis le filament a un lent mouvement en arrière, en raison du décrochage de nombreux moteurs, jusqu'à ce qu'une cascade de coups de force se produise à nouveau.

est opposé à celui observé expérimentalement dans les muscles (Fabiato et Fabiato, 1978; Ishiwata et coll., 2007), où la phase lente des oscillations de contraction est systématiquement dans la direction de la contraction.

La synchronisation des coups de force, dans des conditions isométriques, peut aussi amener un comportement oscillant. Avec le même modèle, la courbe T2 d'un demi-sarcomère, définie de la même manière que (Huxley et Simmons, 1971) mais normalisée au nombre de moteurs attachés, peut présenter une zone de raideur négative instable (Fig. I.35(b)). Le mécanisme d'oscillation est le suivant (Fig. I.35(c)) : lorsque le système est soumis à une charge, il peut exister dans deux configurations stables : l'une où la majorité des moteurs est dans l'état A1, et l'autre où la majorité est dans l'état A2. Dans ce dernier cas, puisque le taux de détachement est plus rapide dans l'état A2, le nombre de moteurs attachés diminue et la force sentie par les moteurs attachés augmente, jusqu'à atteindre la zone instable, où les moteurs attachés passent en bloc dans l'état A1, par un renversement de leur coup de force, ce qui fait passer le système de l'autre côté de la courbe. Dans l'état A1 le taux de détachement diminue, donc le nombre de moteurs attachés tend à augmenter, faisant diminuer la force par moteur, jusqu'à ce que, de manière symétrique, le système atteigne le domaine instable. De nouveau une transition en masse vers l'état 2 se produit. Les oscillations obtenues par ce mécanisme sont irrégulières (Fig. I.35(a)). Notons par ailleurs que ce mécanisme limite intrinsèquement l'amplitude des oscillations à des dimensions de l'ordre du déplacement produit par un moteur individuel, c'est-à-dire quelques nanomètres.

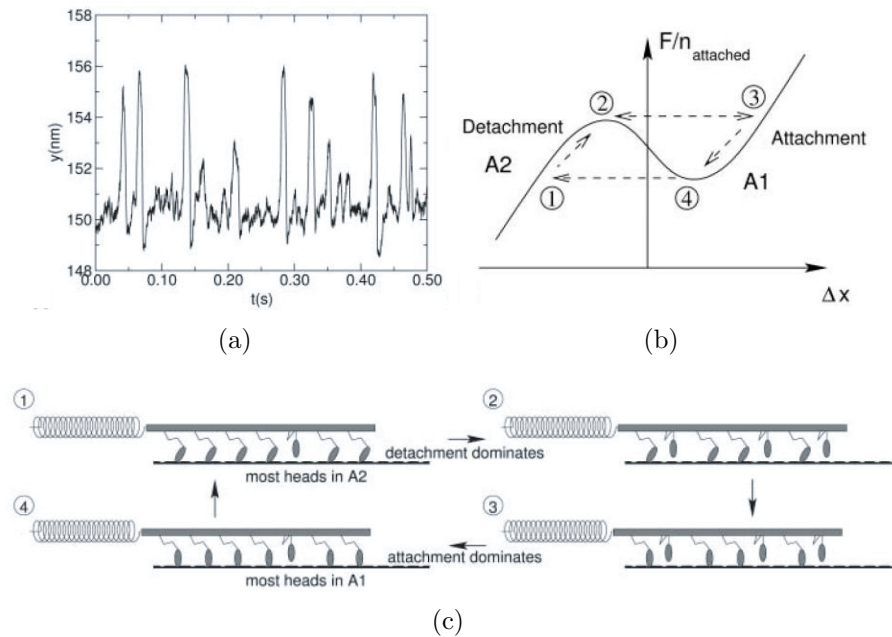


FIG. I.35: **Comportement d'un demi-sarcomère dans un modèle à trois états**

(a) Instabilité oscillatoire du système lorsqu'il est couplé à un ressort. On observe quelques cycles irréguliers d'oscillation, d'amplitude 5 nm environ.

(b) Relation force par moteur attaché-déplacement en régime transitoire (courbe T2) d'un demi-sarcomère, présentant une zone instable de raideur négative. Δx quantifie le déplacement du filament d'actine par rapport aux moteurs. Quand $\Delta x > 0$, le ressort lié aux moteurs se tend, ce qui défavorise la production de coups de force par les moteurs pour passer dans l'état A2, qui augmenterait encore la tension.

(c) Schéma des différentes répartitions de population des moteurs entre les états A1, A2 et détaché, en fonction de la position sur la courbe force-déplacement illustrée en (b), au cours d'une oscillation. Extrait de (Vilfan et Duke, 2003)

Récemment, une autre étude a été publiée (Günther et Kruse, 2007), basée sur des taux de détachements dépendant de la force extérieure. Ces auteurs proposent un modèle microscopique de sarcomère dans lequel les moteurs sont caractérisés par une relation force-vitesse linéaire, et un taux de détachement de l'actine augmentant exponentiellement avec la force appliquée, quelle que soit la direction de celle-ci. Dans ces conditions, le diagramme de phase du sarcomère présente une région correspondant à un régime d'oscillations spontanées, reproduisant la forme triangulaire caractéristique des oscillations observées expérimentalement, et dont l'amplitude n'est pas limitée à quelques nanomètres comme dans le modèle précédent. L'idée que des taux de détachement dépendants de la force suffise à produire un comportement oscillant avait déjà été suggérée, sur la base d'un modèle similaire pour décrire les oscillations du fuseau mitotique lors de la division cellulaire asymétrique (Grill et coll., 2005).

3.2 Modèle à deux états du comportement collectif de moteurs moléculaires

Description générale

Un modèle de la dynamique des moteurs agissant de manière collective a été proposé (Jülicher et Prost, 1995; Jülicher et Prost, 1997; Jülicher et coll., 1997). Contrairement au modèle du “coup de force”, exposé au chapitre I, qui cherche à décrire en détail le cycle mécano-chimique d’un moteur, ce modèle cherche à déterminer les types de comportement collectif qui peuvent émerger d’un système de moteurs, et prend uniquement en compte les deux caractéristiques générales du fonctionnement d’un moteur, au détriment des autres détails moléculaires :

1. les moteurs interagissent avec un filament du cytosquelette et exercent une force.
2. l’interaction est modulée par la réaction d’hydrolyse d’un nucléotide.

Ces deux caractéristiques sont modélisées de la manière suivante : on considère une assemblée de N moteurs rigidement couplés périodiquement espacés; chaque moteur peut être dans deux états énergétiques, un état “libre” (état 2), d’énergie potentielle W_2 constante et un état “attaché”, caractérisé par un potentiel périodique W_1 , de périodicité égale à celle du filament (Fig. I.36(a)). W_1 est un potentiel d’interaction entre les moteurs et le filament. Aussi, même si le filament est polaire, donc asymétrique, W_1 peut être symétrique selon le type de moteur que l’on considère. La périodicité des moteurs et celle du filament sont incommensurables, comme c’est le cas dans les muscles, et ce critère est aussi équivalent, dans la limite où N est grand, à une situation où les moteurs sont répartis aléatoirement, ce qui se produit dans les expériences *in vitro*.

Dans l’état 1, chaque moteur produit une force égale à la dérivée spatiale locale du potentiel. Les transitions entre les deux états peuvent être des transitions thermiques, obéissant aux lois de l’équilibre thermodynamique, ou des transitions d’origine chimique, médiées par l’hydrolyse de l’ATP et traduisant le fait que l’ensemble du système opère hors équilibre. Par conséquent, les taux de transition $\omega_1(x)$ et $\omega_2(x)$ sont reliés par :

$$\omega_1(x) = \omega_2(x)e^{(W_1(x)-W_2(x))/(k_B T)} + \Omega\theta(x) \quad (\text{I.22})$$

Le premier terme est dicté par les lois de l’équilibre thermodynamique, et le deuxième caractérise les transitions hors d’équilibre. Le paramètre Ω quantifie l’écart à l’équilibre. La fonction $\theta(x)$, et par suite les excitations de l’état 1 à l’état 2 hors d’équilibre, sont localisées spatialement à proximité du minimum de potentiel, ce qui traduit l’existence de sites actifs le long du filament I.36(b).

Avec ces hypothèses, il est possible de calculer la force à appliquer sur le système pour que le filament se déplace avec une vitesse donnée par rapport aux moteurs. Dans la limite N infini, l’activité des moteurs se traduit par une force effective dépendant de la vitesse avec une pente négative (Jülicher et Prost, 1995), comportement opposé à un comportement visqueux selon lequel la force à appliquer croît

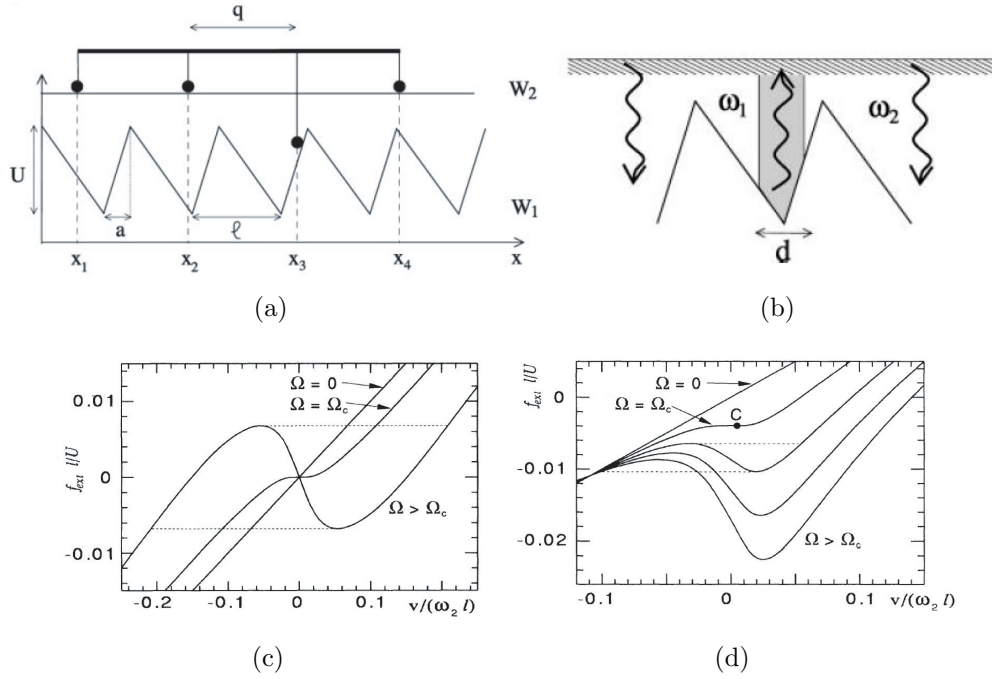


FIG. I.36: **Modèle à deux états du comportement collectif de moteurs moléculaires**

(a) Un ensemble de moteurs périodiquement espacés (période q) et rigidement couplé interagissent avec un filament via les potentiels W_2 et W_1 , périodique de période l . W_1 est ici représenté asymétrique.

(b) Seules les transitions hors d'équilibre sont ici schématisées. Le taux de transition de 1 à 2, ω_1 , est localisé près du minimum du potentiel, et le taux de transition de 2 à 1, ω_2 est constant. (a) et (b) : Extrait de (Badoual et coll., 2002).

(c) et (d) Relations force-vitesse calculées pour différentes valeurs du paramètre Ω dans le cas d'un grand nombre de moteurs et d'un potentiel W_1 symétrique (c) ou asymétrique (d). Dans les deux cas, il existe une valeur critique Ω_c au-delà de laquelle la courbe devient non monotone. Extrait de (Jülicher et Prost, 1995).

linéairement avec la vitesse. Pour de faibles valeurs de Ω , la friction passive reste prépondérante, mais il existe une valeur critique Ω_c où se produit une transition de phase dynamique. Au-delà de cette valeur, le comportement actif des moteurs devient suffisant pour donner lieu à une relation force-vitesse globale non monotone, avec une région de pente négative. Cette région définit un ensemble d'états stationnaires instables.

Potentiel symétrique

Lorsque le potentiel W_1 est symétrique, la courbe est symétrique par rapport à l'origine (Fig. I.36(c)). En particulier, il existe trois vitesses possibles à force nulle, deux correspondant à des états stationnaires stables, de même valeur absolue mais opposées, et la dernière, correspondant à une vitesse nulle, dans la zone instable. Le système peut donc produire un mouvement dans les deux sens, avec la même vitesse, comme il l'a été observé avec le moteur NK11 (Endow et Higuchi, 2000, et

cf p. 53). Dans la limite N infini les fluctuations sont abolies : lorsqu'une valeur de vitesse a été choisie, le système garde cette vitesse indéfiniment. En reprenant le même modèle, mais avec un nombre fini de moteurs, (Badoual et coll., 2002) ont montré que les fluctuations permettent de rendre compte des changements abrupts de direction observés expérimentalement. Plus le nombre de moteurs est faible, plus les fluctuations sont importantes et détruisent les caractéristiques mises en évidence dans la limite N infini. Ainsi, plus N est faible plus les renversements de sens de mouvement sont fréquents. Pour $N \lesssim 50$, la coexistence de deux valeurs bistables de la vitesse est effacée par les fluctuations.

Potentiel asymétrique

Dans le cas d'un potentiel asymétrique, la relation force-vitesse traduit cette asymétrie : la relation force-vitesse n'est plus symétrique par rapport à l'origine. A force nulle, il existe une seule valeur de vitesse, non nulle et stable à l'état stationnaire. Cette situation modélise un test de motilité classique avec des myosines II. En-dessous du seuil $\Omega = \Omega_c$, la force d'arrêt des moteurs, correspondant à une vitesse nulle, est unique et correspond à un état d'équilibre stable. Au-dessus du seuil, comme dans le cas symétrique, la relation force-vitesse devient non-monotone et le point de vitesse nulle devient instable. Ainsi, si on applique une force négative sur le système, on peut l'amener dans une région "bistable" où trois valeurs de vitesse sont possibles, dont l'une est interdite. Ce comportement correspond aux observations expérimentales où des filaments d'actine interagissent avec des moteurs et sont soumis à une force constante imposée par un champ électrique externe (Riveline et coll., 1998, et fig. I.33).

Oscillations spontanées

Le couplage d'un système de moteurs caractérisé par une relation force-vitesse non monotone avec un élément exerçant une force de rappel élastique entraîne naturellement l'apparition d'oscillations spontanées (Jülicher et Prost, 1997), selon le mécanisme décrit figure I.37(a). La forme des oscillations dépend de la distance au seuil, c'est-à-dire formellement de $\Omega - \Omega_c$: à proximité du seuil, les oscillations sont sinusoïdales, et triangulaires loin du seuil (Fig. I.37(b)). Dans la mesure où elles sont basées sur un comportement non-linéaire de la relation force-vitesse, et non pas force-déplacement, les oscillations prédites par ce modèle ne sont pas limitées en amplitude, et peuvent être grandes devant le déplacement produit par un moteur individuel.

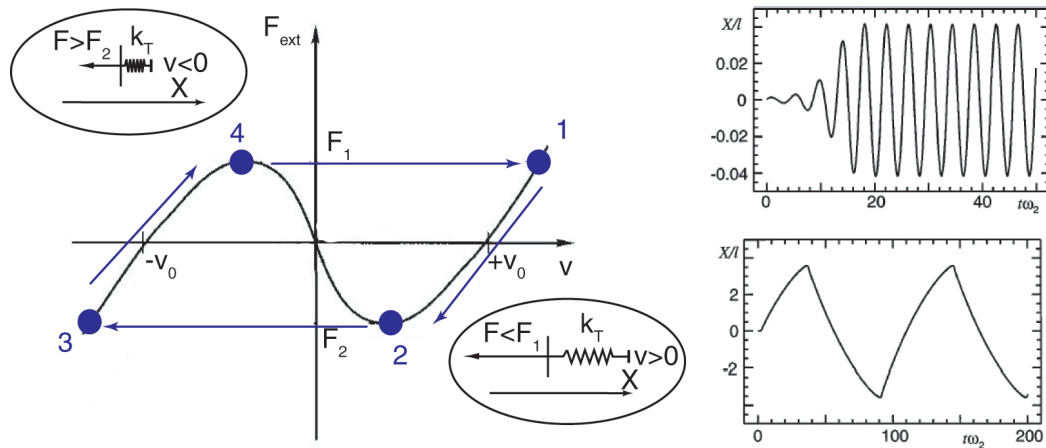


FIG. I.37: **Oscillations d'une assemblée de moteurs couplée à un ressort**

(a) Les moteurs sont caractérisés par une relation force-vitesse présentant une zone de pente négative, définissant un domaine de vitesses instables. On a considéré ici un système symétrique pour simplifier. Si les moteurs sont couplés à un élément élastique de raideur k_T , ils peuvent effectuer des cycles d'oscillations selon le mécanisme suivant : au point 1, la vitesse des moteurs est positive, et la force exercée par le ressort vaut F_1 . En réponse au mouvement des moteurs dans la direction positive, la force élastique diminue par rapport à F_1 ce qui tend à ralentir les moteurs, jusqu'au point 2, au bord de la zone instable. Les moteurs sautent alors, à force constante F_2 , de l'autre côté de la zone instable, dans le domaine des vitesses négatives (point 3). Le mouvement des moteurs dans la direction opposée provoque une augmentation de la force élastique, jusqu'à ce que le système arrive au point 4. De nouveau, le système saute de l'autre côté de la zone instable pour revenir au point 1.

(b) A proximité du seuil, la zone instable est de faible extension et les oscillations sont sinusoidales. Loin du seuil, les oscillations sont triangulaires ; leur forme symétrique reflète la symétrie du potentiel.

4 Conclusion

Historiquement, la recherche sur le fonctionnement des moteurs moléculaires a suivi une approche “du haut vers le bas”, des muscles à la molécule unique, inverse de celle que nous avons adoptée dans ce chapitre pour effectuer un tour d'horizon, évidemment non exhaustif, des connaissances actuelles sur l'interaction actine-myosines à différentes échelles. Cette démarche, qui a grandement réduit la complexité des systèmes étudiés, a été couronnée de succès sous bien des aspects, puisque le mécanisme moléculaire et les différentes étapes du cycle mécano-chimique des myosines sont élucidés, ou en voie de l'être, avec de plus en plus de détails et de précision. Cependant, nous l'avons vu, un certain nombre de phénomènes, observés à des échelles supramoléculaires, restent relativement inexplicables en dépit de ces grandes avancées.

Il semble que, dans le processus de réduction de la complexité des systèmes étudiés qui a piloté l'évolution de la recherche, le niveau intermédiaire, entre la molécule unique et le système physiologique complet – et complexe –, d'étude de petits ensembles de moteurs moléculaires, ait été relativement négligé. Les expériences de motilité *in vitro*, qui de fait mettent en jeu de nombreux moteurs, ont assez rare-

ment donné lieu à des mesures de forces, et le plus souvent l'accent était mis sur la mesure, à travers le mouvement collectif, de paramètres individuels des moteurs.

Différentes études théoriques du comportement collectif des moteurs moléculaires, que nous avons détaillées, ont déjà vu le jour. La plus importante partie des travaux que nous allons présenter dans la suite de ce manuscrit constituent une tentative, au niveau expérimental, pour explorer cette échelle intermédiaire et étudier certaines propriétés nouvelles qui peuvent y émerger, afin d'aider à relier les études sur les moteurs individuels et les études sur les systèmes physiologiques.

Chapitre II

Techniques et méthodes expérimentales

DANS ce chapitre, nous présentons les différentes expériences que nous avons effectuées. Dans tous les cas, les manipulations proprement dites et les mesures physiques ont mis en jeu une instrumentation dont le développement et la mise au point ont constitué une part importante du travail dont ce manuscrit fait l'objet. Nous détaillerons dans une première partie les différents aspects de ce dispositif. Nous aborderons ensuite l'aspect biochimique des techniques expérimentales que nous avons mises en oeuvre pour l'étude *in vitro* de moteurs moléculaires de type myosine.

A Instrumentation

La description de l'aspect instrumental de notre dispositif expérimental est volontairement très détaillée, afin qu'elle puisse servir de guide aux futurs utilisateurs. Pendant toute la conception de l'appareillage, nous avons essayé de maintenir la plus grande flexibilité possible pour éventuellement incorporer d'autres fonctionnalités ou tenir compte de contraintes nouvelles. Néanmoins, l'objectif qui a présidé à sa construction était d'effectuer des mesures mécaniques *in vitro* sur des moteurs moléculaires à l'échelle de la molécule unique, en reproduisant une géométrie "à trois billes" bien décrite dans la littérature (Finer et coll., 1994; Veigel et coll., 1998). Les déplacements et les forces exercés par les moteurs moléculaires se situent typiquement aux échelles du piconewton et du nanomètre respectivement. Ce type d'expérience implique d'avoir une résolution suffisante pour mesurer ces grandeurs, mais aussi d'être capable de stimuler le système étudié en appliquant des déplacements et des forces du même ordre. Pour cela nous avons utilisé comme intermédiaire des billes de diamètre micrométrique, liées chimiquement aux molécules d'intérêt, que nous manipulons à l'aide d'une pince optique. Il peut aussi s'avérer utile d'agir "chimiquement" sur le système en décageant dynamiquement des composés chimiques piégés par des molécules-cages photolysables par de la lumière UV.

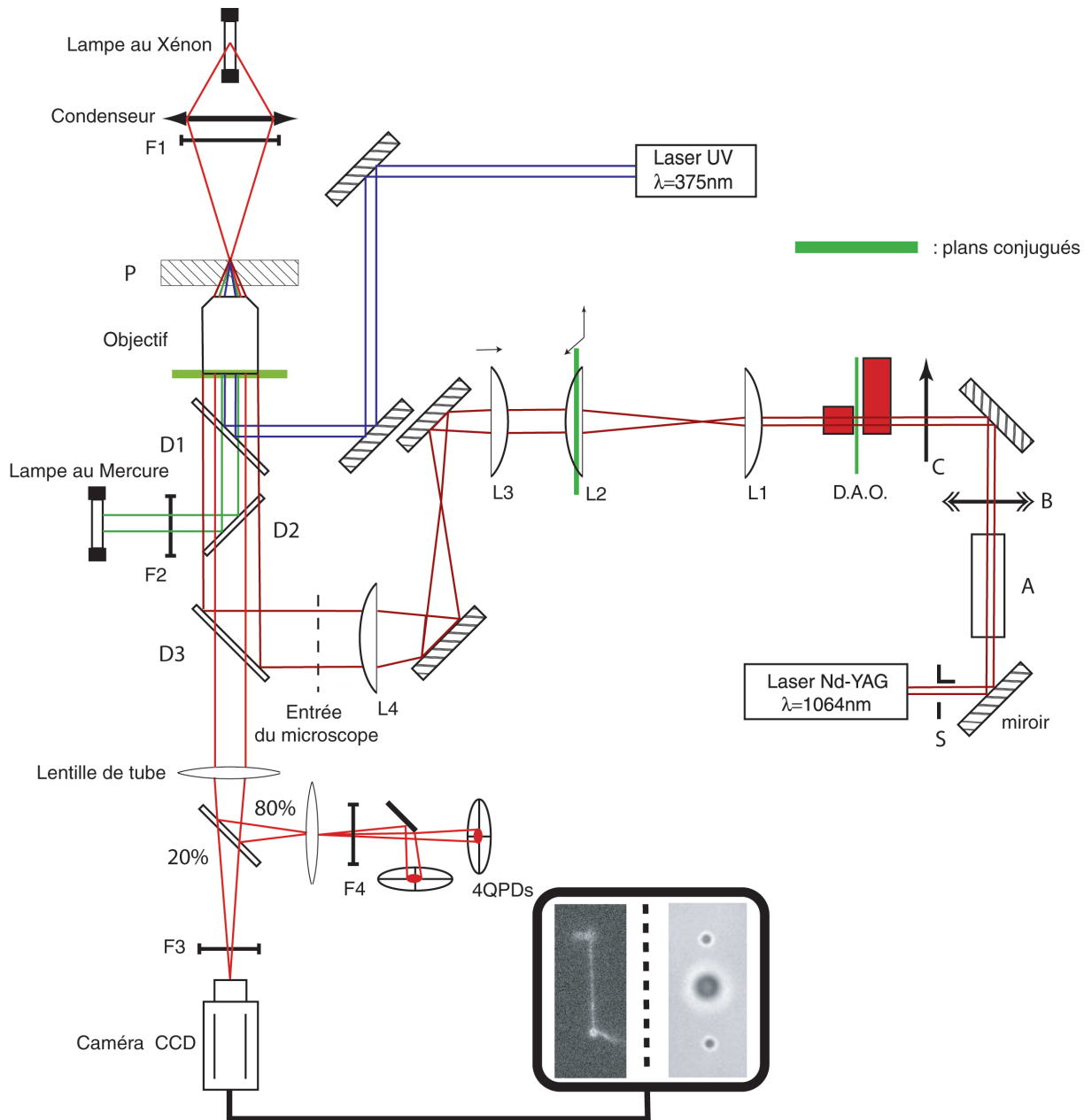


FIG. II.1: **Schéma du montage optique utilisé pour nos expériences.**

Pince : Un laser infrarouge de forte puissance (Laser continu, $\lambda = 1064$ nm, puissance nominale 4W ; BL106C Spectra Physics) traverse un isolateur optique (A ; IO-3-1064-VHP, OFR) afin d'éviter le retour d'intensité dans la cavité laser, puis deux déflecteurs acousto-optiques croisés (D.A.O. ; DTS.XY.75/B30/A.4.5, AA Optoelectronics). La polarisation du faisceau est ajustée en amont sans perte d'intensité à l'aide d'une lame demi-onde (B) et d'un polariseur (C). Après les déflecteurs, le faisceau est agrandi 10 fois par deux télescopes successifs T1 (grandissement $G_1 = 3$) et T2 (grandissement $G_2 = 3.33$). T1 est constitué des lentilles L1 ($f'_1 = 5$ cm) et L2 ($f'_1 = 15$ cm), T2 des lentilles L3 ($f'_3 = 7,5$ cm) et L4 ($f'_4 = 25$ cm). Le laser entre ensuite dans un microscope inversé (modèle IX71, Olympus). Nous avons utilisé une sortie caméra latérale dont dispose ce microscope et remplacé le miroir standard du microscope par un miroir dichroïque passe-bas (D3, $\lambda_c = 1000$ nm ; 1000dcp, Chroma Fluo). Après avoir été réfléchi, le faisceau laser illumine la pupille arrière d'un objectif à grande ouverture numérique (objectif à immersion à huile UPlanSApo x60, ouverture numérique 1.35). L'objectif focalise le faisceau dans son plan focal où des billes en silice d'1 μm de diamètre sont piégées. L2 peut être translatée dans les deux directions transverses afin de déplacer manuellement le piège, et L3 peut être déplacée longitudinalement pour affiner le réglage de la focalisation du laser. Dans le plan des pièges, une platine piézoélectrique trois axes (P ; E710.P3D, Physik Instrument) permet en outre le positionnement des échantillons avec une précision nanométrique. Compte tenu des contraintes de grandissement et de conjugaison, les distances imposées entre les composants sont : L1-L2 : 20 cm, L3-L4 : 32,5 cm, D.A.O.-L1 : 6,3 cm, L2-L3 : 7,5 cm, L4-obj. : 25 cm. S est un shutter contrôlable soit par ordinateur soit par une pédale afin de couper facilement et brièvement le piège pendant les expériences.

Détection : La lumière d'une lampe à arc au xénon, passée au travers d'un filtre passe-bas (F1, $\lambda_c = 650$ nm ; 03FCG501/RG610 Melles Griot) est focalisée par le condenseur sur le plan de piégeage. Une image des billes piégées est ensuite formée par l'objectif et la lentille de tube, puis agrandie par un insert x10 et projetée sur des photodiodes à quatre quadrants (S1557, Hamamatsu), après un filtre passe-bas destiné à couper la lumière du laser IR résiduelle (F4 ; 03SWP426, Melles Griot). Une partie de l'intensité lumineuse (20 %) est envoyée sur une caméra CCD (CoolSnap ES, Photometrics) pour visualiser le déroulement de l'expérience. La visualisation peut aussi s'effectuer en épifluorescence, grâce à un jeu de filtres de fluorescence dédié au fluorophore Alexa 594 (filtre d'excitation F2 (HQ560/40), filtre d'émission F3 (D630/60), miroir dichroïque D2 (Q585lp-1064t), Chroma Fluo) dont le miroir dichroïque a été modifié sur mesure pour laisser passer le laser de piégeage.

Libération in situ de composés chimiques cagés : Un laser UV continu (375 nm, 7 mW, Oxixus) est également couplé au microscope par une lame dichroïque passe-haut (D_1 , $\lambda_c = 525$ nm ; FM04, Thorlabs) et focalisé par l'objectif à proximité des billes piégées.

Le “cahier des charges”, qui va nous servir dans cette section de fil conducteur, est donc le suivant :

- Construire une pince optique permettant d’appliquer des forces jusqu’à quelques dizaines de piconewtons, dont la position peut être contrôlée à quelques nanomètres près, et modulée plus rapidement que les temps caractéristiques du système étudié, c’est-à-dire en pratique à une fréquence supérieure à 10 kHz environ.
- Pouvoir délivrer localement de la lumière UV à proximité du système avec une intensité suffisante pour photolyser rapidement des composés cagés.
- Pouvoir effectuer des observations en fluorescence.
- Développer une méthode de détection permettant de mesurer la position de billes piégées avec une résolution nanométrique également, et une bande passante qui permette de mesurer les temps de réponse du système étudié. En pratique les temps les plus courts mesurés sont supérieurs à 100 μ s.
- Définir des méthodes de calibration des différents dispositifs, pratiques et efficaces afin qu’elles puissent être facilement reproduites pour tenir compte de la variabilité des conditions d’une expérience à l’autre.
- Interfacer l’ensemble du dispositif par ordinateur, condition *sine qua non* pour tirer parti de la précision et de la rapidité des différents outils.

1 Pince optique

La démonstration expérimentale par A. Ashkin de la possibilité de piéger des objets diélectriques microscopiques par des forts gradients d’intensité électromagnétique remonte à une vingtaine d’années (Ashkin, 1970; Ashkin et coll., 1986). Depuis, les pièges optiques ont été développés et utilisés dans de nombreux laboratoires, en particulier dans le domaine des moteurs moléculaires (Svoboda et Block, 1994b; Mehta et coll., 1998) pour lequel la gamme de force, de quelques pN, s’accommode bien de l’utilisation de cette technique, ou encore de la mécanique cellulaire (Guck et coll., 2001; Gallet, 2004). Il existe de nombreuses publications ou revues expliquant le principe et la mise en oeuvre d’une pince optique, à différents degrés d’élaboration (Svoboda et Block, 1994a; Visscher et Block, 1998; Molloy, 1998), et ce genre de système est presque devenu un instrument de routine.

Pour toutes ces raisons, nous n’allons pas détailler la théorie et les principes du piégeage optique. Nous rappellerons simplement les contraintes pratiques fondamentales qui justifient la présence des différents composants du montage optique présenté Fig. II.1. Les lecteurs familiers de ce genre d’instruments trouveront une description rapide du montage dans la légende de cette figure. Pour les éventuels nouveaux arrivants dans ce domaine, nous allons dans ce qui suit décrire avec précision les différents points du montage.

1.1 Laser de piégeage optique

Pour piéger des objets diélectriques polarisables, il convient de créer des gradients d’intensité les plus importants possibles. Pour cela, l’idée de base du montage

consiste à focaliser un faisceau laser de forte puissance par un objectif de microscope à grande ouverture numérique, afin d'obtenir un piège optique dans le plan focal de l'objectif. Afin de profiter également de ses fonctionnalités d'imagerie, tout notre dispositif est construit autour d'un microscope inversé (Olympus, modèle IX71).

Nous avons utilisé un laser émettant dans l'infrarouge (IR). Le choix de ce domaine de longueur d'onde s'explique par la relativement faible toxicité du rayonnement IR pour les échantillons biologiques, et à la bonne transparence de l'eau dans ce domaine spectral (Peterman et coll., 2003). Nous utilisons un laser continu émettant à 1064 nm avec une puissance nominale de 4 W, polarisé rectilignement (BL106C, Spectra Physics). Le laser est pompé par une première diode laser, dont le courant de commande détermine la puissance IR délivrée (Fig. II.2).

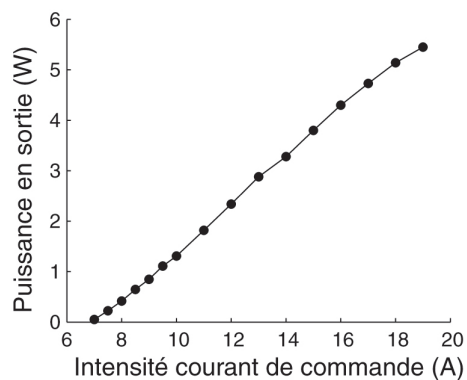


FIG. II.2: **Puissance du laser en fonction de son intensité de commande**

La puissance délivrée est proportionnelle à l'intensité de pompage et peut dépasser la puissance nominale de 4 W.

L'émission IR a lieu si ce courant de commande est supérieur à une valeur seuil de 7 A. Le laser est cependant conçu pour fonctionner de manière optimale à sa puissance maximale. La puissance délivrée peut devenir particulièrement fluctuante lorsqu'on est proche du seuil d'émission. De plus, lorsqu'on change le courant de pompage, le laser met un certain temps avant d'atteindre un nouvel état stable. C'est pourquoi nous travaillons habituellement à une intensité de 16 A, qui donne une puissance proche de la puissance nominale du laser. Nous modulons l'intensité entrant dans le microscope par un autre procédé que nous décrirons plus loin.

Le laser traverse un obturateur, qui peut être commandé soit par ordinateur, soit par une pédale afin que l'expérimentateur puisse couper brièvement le piège pendant que ses mains sont occupées à manipuler. Nous nous sommes aperçus, lorsque le montage est bien aligné, que les réflexions sur les différents dioptres renvoient une partie de la lumière émise par le laser à l'intérieur de la cavité. Dans ces conditions le faisceau devient instable et son intensité fluctue de manière importante, atteignant parfois des valeurs supérieures à la valeur délivrée par le laser en l'absence de retour ! Nous avons donc installé un isolateur optique (IO-3-1064-VHP, OFR), qui empêche les faisceaux réfléchis de revenir dans la cavité.

1.2 Déflecteurs acousto-optiques (D.A.O.)

Imposer dynamiquement une force ou un déplacement au système d'intérêt implique de pouvoir déplacer le piège et contrôler sa position avec une résolution nanométrique. Pour déplacer le piège dans le plan focal de l'objectif, il faut modifier l'angle d'incidence du faisceau sur la pupille arrière. Nous utilisons pour cela deux déflecteurs acousto-optiques croisés, un pour chaque direction du plan de piégeage. Un D.A.O. est constitué d'un cristal anisotrope (dans notre cas de l'oxyde de tellurium TeO_2) sur le côté duquel est collé un actuateur piézoélectrique. L'application d'une tension sinusoïdale radiofréquence aux bornes de l'actuateur produit dans le cristal une onde acoustique de même fréquence, transverse à la direction de propagation du laser. Dans une description simplifiée de l'interaction acousto-optique, cette onde acoustique se comporte comme un réseau d'indice optique, dont le pas est égal à sa longueur d'onde λ_a , et à ce titre elle diffracte le faisceau laser.

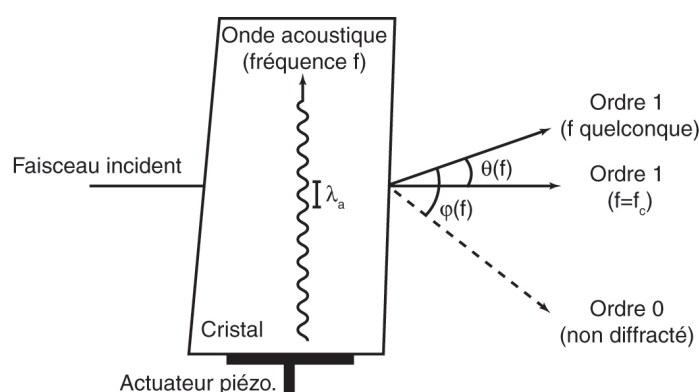


FIG. II.3: Schéma de la diffraction du laser par un cristal de TeO_2

L'onde acoustique à l'intérieur du cristal diffracte le laser de manière analogue à un réseau optique. Seuls les ordres 0 (non diffracté) et 1 de la diffraction sont représentés. L'angle de déflexion de l'ordre 1 par rapport à l'ordre 0 dépend de la fréquence de l'onde. Les faces d'entrée et de sortie du cristal ne sont pas parallèles ni orthogonales à la direction du faisceau incident, si bien que l'ordre 0, où la déviation induite par l'effet acousto-optique est nulle, est dévié par réfraction. A la fréquence centrale, l'ordre 1 n'est pas dévié par rapport à la direction du faisceau incident.

Angle de déflexion

En présence d'une onde acoustique, le système est conçu pour maximiser l'intensité lumineuse dans l'ordre 1 de diffraction. La formule bien connue des réseaux optiques donne l'angle de diffraction ϕ dans cet ordre :

$$\phi = \frac{\lambda}{\lambda_a}. \quad (\text{II.1})$$

Si f est la fréquence de l'onde acoustique et v la vitesse de propagation de l'onde acoustique dans le cristal ($v = 650 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ dans notre cas), on a $\lambda_a = v/f$, ce qui

donne la relation de proportionnalité suivante entre l'angle de déflexion du laser et la fréquence de l'onde acoustique :

$$\phi = \frac{\lambda f}{v}. \quad (\text{II.2})$$

Le couplage acousto-optique n'est raisonnablement efficace que sur une certaine

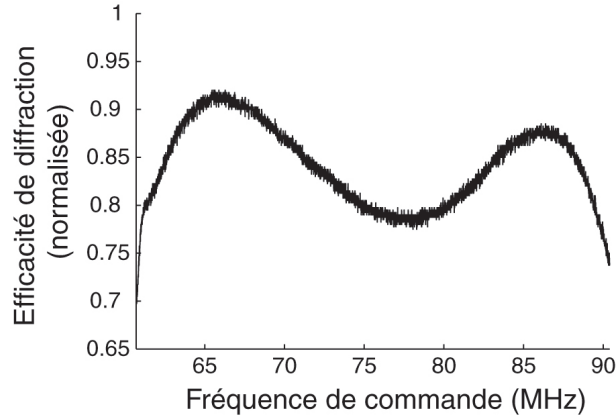


FIG. II.4: **Efficacité de la diffraction dans l'ordre 1 par un défecteur**
A la fréquence centrale, la transmission est d'environ 80%.

gamme de fréquence Δf (Fig. II.4). Nos D.A.O. sont caractérisés par une bande passante particulièrement large de 30 MHz (de 60 à 90 MHz). La déflexion maximale $\Delta\theta$ d'un bout à l'autre de cette bande passante vaut

$$\Delta\theta = \frac{\lambda\Delta f}{v} = 49 \text{ mrad}. \quad (\text{II.3})$$

Pour une onde acoustique de fréquence égale à la fréquence centrale de la bande passante $F_c = 75,5$ MHz, les cristaux de TeO_2 sont taillés et orientés de telle sorte que le faisceau laser incident soit diffracté (ordre 1) sans déviation. Le faisceau transmis (ordre 0) est, lui, dévié et sort du chemin optique qui conduit au microscope (Fig. II.3). A partir de l'équation II.3, il est immédiat de voir que par rapport à sa direction incidente, le laser est défléchi en sortie d'un angle

$$\theta = \frac{\lambda(f - f_c)}{v} \quad (\text{II.4})$$

En utilisant un générateur de fréquence piloté numériquement (DDS.62-92.D47.2out, AA Optoelectronics) on peut aisément contrôler la déflexion du faisceau, et donc la position du piège. Un autre avantage des D.A.O. est leur rapidité : nous avons mesuré qu'il est possible d'imposer une déflexion sinusoïdale du faisceau laser jusqu'à des fréquences d'au moins 80 kHz, ce chiffre correspondant à la bande passante du détecteur utilisé pour mesurer l'intensité défléchie (Position Sensing Detector, DL-16-7PCBA3, Pacific Silicon Sensor). Nous avons tiré avantage de cette rapidité de

déflexion pour produire plusieurs pièges à partir d'un seul laser (Molloy et coll., 1995b). Il suffit de focaliser le faisceau séquentiellement en différentes positions, à des fréquences très supérieures aux fréquences de coupure des billes piégées (de l'ordre de 1 kHz), pour empêcher qu'une bille n'ait le temps de diffuser pendant le court intervalle de temps durant lequel le laser est focalisé à une autre position pour piéger une autre bille.

Résolution de position du piège

Le générateur de fréquence que nous utilisons est un synthétiseur numérique : il délivre un signal dont la fréquence f est commandée par un nombre entier N codé sur 15 bits, selon la formule donnée par le constructeur :

$$f = \frac{125N}{2^{15}} \text{ MHz} \quad (\text{II.5})$$

L'avantage d'une commande numérique sur une commande analogique, bruitée par nature, est qu'elle permet une plus grande précision sur la génération d'une fréquence. En revanche, le nombre de bits de codage limite ultimement la résolution en fréquence : puisque $\delta N = 1$, on a $\delta f = 3,8145 \text{ kHz}$, soit $\delta \theta = 6,24 \mu\text{rad}$. L'objectif que nous utilisons a une focale $f' = 3 \text{ mm}$ (voir l'annexe "Comment calculer la distance focale d'un objectif de microscope"). Le pas de déplacement du piège que nous permettent les D.A.O. est donc

$$\delta x_0 = f' \delta \theta = 18,7 \text{ nm}, \quad (\text{II.6})$$

ce qui est une valeur inacceptable compte tenu de notre cahier des charges.

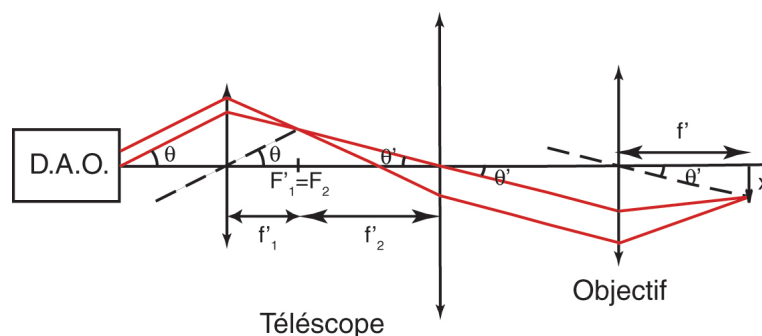


FIG. II.5: Schéma de la propagation du faisceau à travers un télescope afocal et l'objectif du microscope.

Le télescope est constitué de deux lentilles convergentes L_1 de focale f'_1 et L_2 de focale f'_2 . F'_1 , foyer image de L_1 , est confondu avec F_2 foyer objet de L_2 . Dans ces conditions, le grandissement du télescope vaut $G = f'_2/f'_1$ et son grossissement angulaire vaut $\gamma = \frac{1}{G}$. L'angle d'incidence θ' du faisceau sur l'arrière de l'objectif détermine la position x de son point de focalisation.

Heureusement, nous devons agrandir le diamètre du faisceau laser pour remplir la pupille arrière de l'objectif (*cf infra*, p. 71) à l'aide d'un système optique de

grandissement $G = 10$. Le grossissement angulaire du télescope est égal à l'inverse de son grandissement $G = \frac{f_2'}{f_1}$ (Fig. II.5). Ainsi, si θ est l'inclinaison du faisceau incident par rapport à l'axe optique, le faisceau émergent sera incliné de $\theta' = \frac{\theta}{G}$. Par rapport à la situation sans télescope que nous décrivions précédemment, on a cette fois un pas de résolution

$$\delta x = \frac{\delta x_0}{G}. \quad (\text{II.7})$$

Nous atteignons donc finalement la résolution nanométrique souhaitée. Toutefois, l'élargissement du faisceau avec un grandissement G entraîne une diminution du même facteur de l'excursion possible pour le piège. Sans grandissement, dans le plan focal de l'objectif, le déplacement maximal vaut :

$$\Delta x_0 = f' \Delta \theta = 147 \text{ } \mu\text{m}. \quad (\text{II.8})$$

En intercalant un grandissement G , cette grandeur devient :

$$\Delta x = \frac{\Delta x_0}{G} = 14,7 \text{ } \mu\text{m}. \quad (\text{II.9})$$

Il y a donc un compromis à trouver entre pouvoir se déplacer sur une petite zone, mais en ayant potentiellement accès à tous ses détails, ou pourvoir explorer un champ plus large, de manière plus grossière. La large bande passante de nos D.A.O. nous permet heureusement de nous déplacer sur une longueur d'environ $15 \text{ } \mu\text{m}$, ce qui est largement suffisant pour nos expériences. Dans la pratique, nous déplaçons une bille piégée dans une gamme de $\pm 150 \text{ nm}$, et dans le cas où on piège deux billes simultanément, celles-ci sont à une distance inférieure à $10 \text{ } \mu\text{m}$.

Efficacité de la diffraction

L'efficacité de l'effet acousto-optique est d'autant plus importante que la puissance de l'onde acoustique est grande. Le synthétiseur de fréquence possède pour chaque axe une commande de tension analogique, de 0 à 10 V, qui détermine l'amplitude du signal radiofréquence qu'il envoie aux actionneurs piézoélectriques, et donc l'amplitude des ondes acoustiques. On peut donc par ce moyen contrôler l'intensité du laser dans l'ordre 1 de diffraction, de manière plus rapide qu'en changeant son intensité de pompage (Fig. II.6).

L'efficacité de diffraction est également très sensible à la direction de polarisation du faisceau incident. La combinaison d'une lame demi-onde et d'un polariseur nous permet de faire tourner sans perte d'intensité la polarisation du laser avant l'entrée dans les défecteurs, pour l'ajuster à l'orientation donnant une efficacité optimale.

1.3 Téléscopes

Lorsqu'on construit un piège optique il est nécessaire d'agrandir le faisceau laser avant qu'il arrive sur l'objectif. En effet, il existe une compétition dans le piège entre les forces de gradient, qui tendent à ramener l'objet vers le point de focalisation, et la

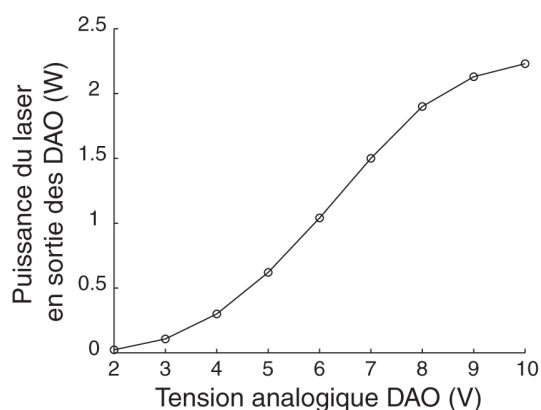


FIG. II.6: Effet de l'amplitude de l'onde acoustique sur l'intensité du faisceau diffracté.

pression de radiation, qui tend à expulser l'objet dans la direction de propagation du faisceau. Pour des objets fortement réfléchissants, le rapport des forces est largement en faveur de la pression de radiation, ce qui explique qu'il est impossible de piéger des billes métalliques. Pour des billes diélectriques, il est possible d'obtenir un piège stable, mais le piégeage sera d'autant plus efficace que la focalisation sera importante. C'est pourquoi il faut profiter au maximum de la grande ouverture de l'objectif, ce qui implique en pratique d'agrandir le diamètre du faisceau pour qu'il surremplisse légèrement la pupille arrière de l'objectif.

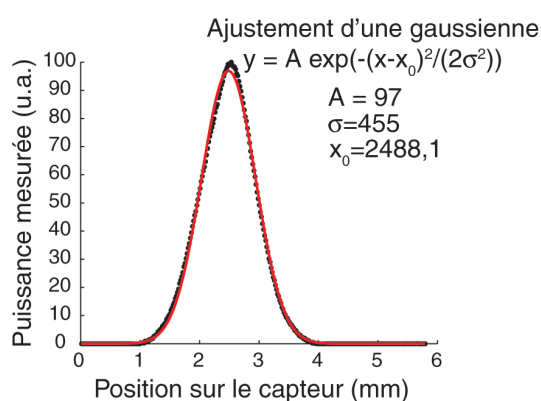


FIG. II.7: Profil du faisceau laser à la sortie des D.A.O.

Mesure effectuée à l'aide d'un analyseur de profil 7 cm après la sortie des D.A.O. Le graphe montre le profil moyenné du faisceau (noir) et l'ajustement d'une gaussienne (rouge), dont le diamètre à $1/e^2$ vaut $910 \mu\text{m}$

A la sortie des déflecteurs, le profil du faisceau est bien gaussien et a un diamètre d'environ 1 mm (Fig. II.7). Notre choix d'un grandissement $G = 10$ satisfait donc la condition de surremplissage puisque la pupille arrière de l'objectif vaut environ 8 mm.

Une dernière contrainte optique doit être prise en compte : si le montage est aligné pour que le faisceau, sans déflexion, attaque l'objectif en incidence normale en surremplissant la pupille arrière, la déflexion du faisceau par les D.A.O. risque de le faire "sortir" de la pupille, à moins que le plan de déflexion, dans notre cas approximativement au milieu des D.A.O, soit conjugué avec la pupille arrière. Afin de garder un montage le plus compact possible, nous avons préféré répartir le grandissement entre deux télescopes T1 et T2 de grandissement 3 et 3,33 respectivement (Fig. II.1) plutôt qu'utiliser un seul télescope de grandissement 10 (Fig. II.8).

Les D.A.O. et L_2 sont conjugués par L_1 . La distance entre L_1 et L_2 est fixée puisqu'elles doivent former un télescope, mais la position des D.A.O en amont de L_1 est libre. Une telle conjugaison est donc possible. L_2 est ensuite conjuguée avec l'objectif par le télescope T_2 . Montée sur deux platines de déplacement micrométriques, L_2 peut également servir à déplacer manuellement le piège : lorsqu'on déplace L_2 , le faisceau est défléchi, ce qui conduit à un déplacement du piège dans le plan focal de l'objectif.

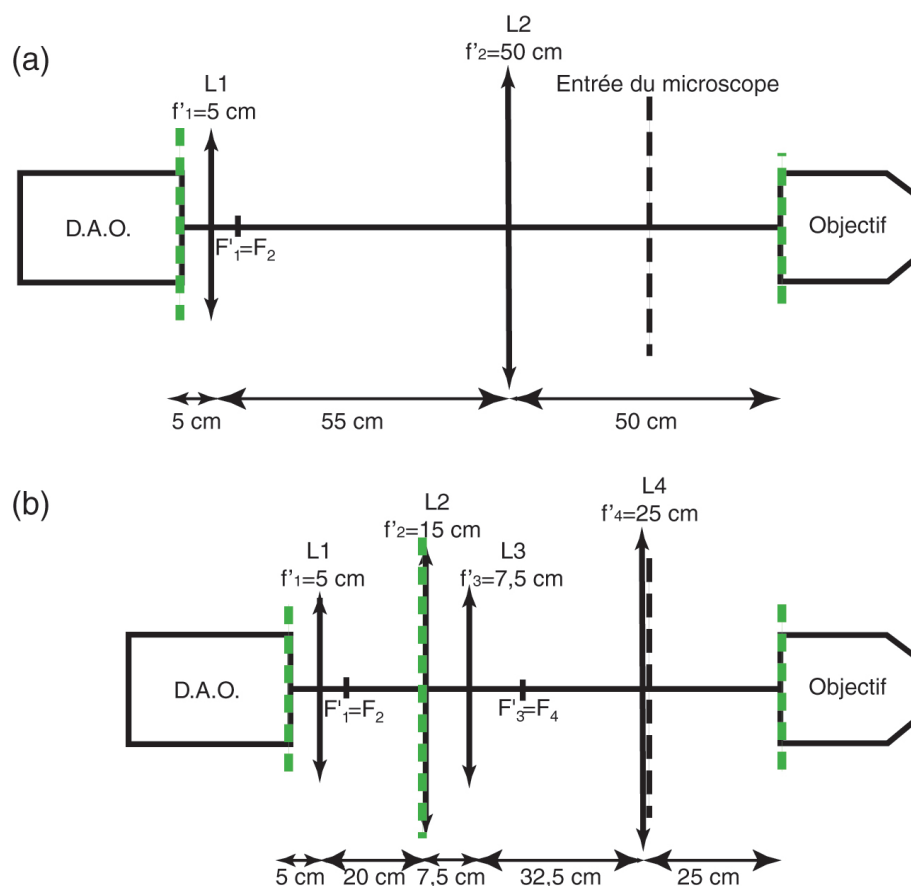


FIG. II.8: Comparaison des configurations à un seul et à deux télescopes

Le seul moyen d'obtenir une image réelle d'un objet réel avec un télescope afocal consiste à les placer respectivement dans le plan focal image de la deuxième lentille et dans le plan focal objet de la première. Les tirets verts représentent les plans optiquement conjugués. (a) En utilisant une première lentille de focale 5 cm, la plus petite envisageable compte tenu de l'encombrement du support des D.A.O., le dispositif le plus compact qui remplisse toutes les conditions nécessaires en utilisant un seul télescope de grandissement 10 occupe 110 cm.

(b) En utilisant deux télescopes de grandissements 3 et 3,33, la longueur du trajet optique est ramenée à 90 cm.

1.4 Objectif

A la sortie des télescopes, le faisceau entre dans le microscope et est réfléchi par un miroir dichroïque vers un objectif à immersion à huile UPlanSAPO (UPlanSAPO x60, ouverture numérique 1,35, Olympus). Cet objectif présente le grand intérêt de transmettre de manière satisfaisante toutes les longueurs d'onde du spectre, de l'IR à l'UV (Fig. II.9), ce qui est nécessaire pour pouvoir simultanément piéger des billes diélectriques et libérer des composés chimiques engagés.

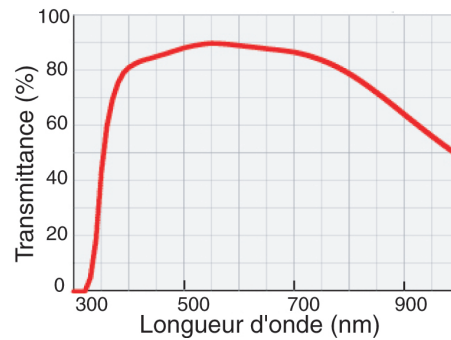


FIG. II.9: **Transmission de l'objectif en fonction de la longueur d'onde**

La transmission est de 50% à 1064 nm et de 75% à 375 nm.

Source : <http://www.microscopy.olympus.eu/microscopes/Optics%20&%20Accessories.htm>

2 Filtres et contraintes optiques diverses

Les nombreuses exigences, en matière d'optique, qui président à la construction du dispositif (piégeage, décageage, détection des billes piégées, microscopie de fluorescence) nous conduisent à tirer profit de tout le spectre de la lumière visible : schématiquement, chaque tâche se voit attribuer un domaine spectral. Cela nécessite la présence de nombreux filtres et miroirs dichroïques disposés en divers endroits du microscope. Le choix et l'agencement de ces filtres ainsi que des sources lumineuses utilisées tendent à optimiser les performances de chaque fonctionnalité de l'appareil compte tenu des contraintes imposées par les autres.

2.1 500-650 nm : Observation en fluorescence

Le système de filtres pour l'observation en fluorescence du fluorophore Alexa 594 contient un filtre d'excitation (HQ560/40, Chroma Fluo), un filtre d'émission (D630/60, Chroma Fluo) et un miroir dichroïque à 45° (Q585lp-1064t, Chroma Fluo), respectivement F_2 , F_3 et D_2 sur la Fig. II.1, dont les spectres de transmission sont donnés Fig. II.10. Le dichroïque réfléchit les longueurs d'onde inférieures à 600 nm ; il a été fabriqué sur mesure pour avoir également une bonne transmission à 1064 nm. L'illumination en mode fluorescence utilise une lampe à vapeur de mercure sous haute pression, dont le doublet vert (Fig. II.15(b)) est situé exactement dans la fenêtre de transmission du filtre d'excitation.

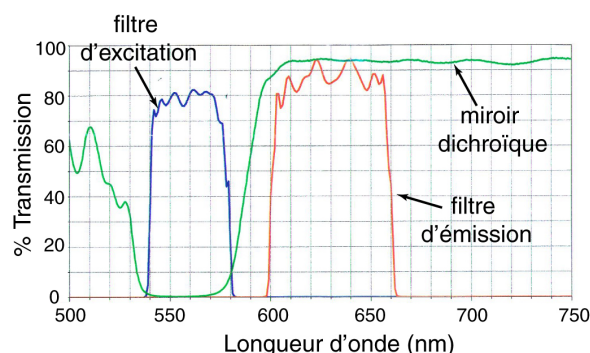


FIG. II.10: **Caractéristiques du cube de fluorescence pour l'Alexa 594**

Le miroir dichroïque transmet également le laser à 1064 nm ce qui permet de piéger tout en observant en fluorescence

2.2 1000 nm et plus : Piégeage

Le laser IR de la pince est envoyé vers l'objectif par un miroir dichroïque passe-bas à 45° (D_3) de longueur d'onde de coupure 1000 nm (1000dcsp, Chroma Fluo), situé sous le dichroïque de fluorescence. Son spectre de transmission est donné Fig. II.11.

La fenêtre spectrale disponible pour la lumière issue de l'objectif et traversant les

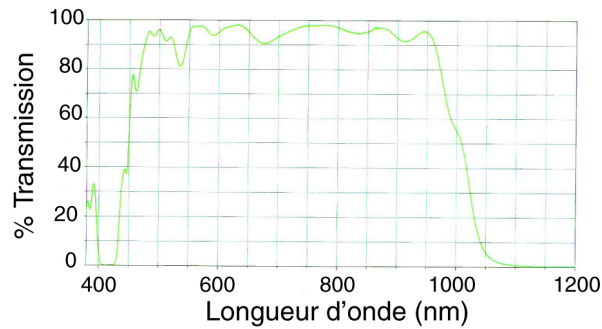


FIG. II.11: **Transmission du miroir dichroïque couplant le laser IR au microscope**

Ce miroir transmet en particulier la lumière en provenance de l'objectif comprise entre 600 et 1000 nm

dichroïques D_2 et D_3 est donc comprise entre 600 et 1000 nm. La présence du filtre d'émission juste avant la caméra, et non pas immédiatement après le dichroïque comme c'est l'usage, permet de ne pas limiter cette fenêtre au domaine de transmission de ce filtre.

2.3 600-1000 nm : Mesure du mouvement des billes piégées

Nous détaillerons le système de détection des billes piégées dans la section suivante (p. 80). Notons simplement ici que la partie photométrique de ce système met en jeu des photodiodes à quadrants, qui présentent la sensibilité spectrale caractéristique des semiconducteurs à base de silicium (Fig. II.12).

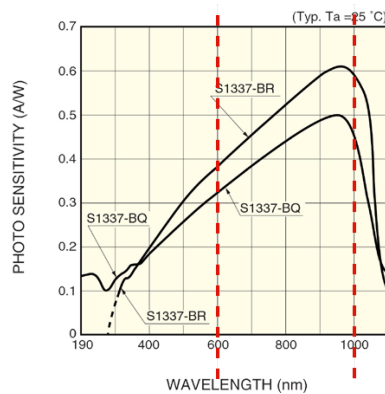


FIG. II.12: **Sensibilité spectrale des photodiodes**

Il ne s'agit pas exactement du modèle que nous utilisons, mais la dépendance illustrée ici est semblable pour tous les modèles à base de silicium. Les lignes rouges délimitent la zone spectrale que nous exploitons.

Le domaine de sensibilité maximale s'ajuste idéalement à la fenêtre spectrale transmise par les deux dichroïques D_2 et D_3 . Les diodes sont très sensibles à l'in-

frarouge, ce qui rend la présence d'un filtre anti-1064 nm (F_4 , 03SWP426, Melles Griot, Fig. II.13(a)) nécessaire pour que la lumière résiduelle venant du laser IR ne perturbe pas les mesures.

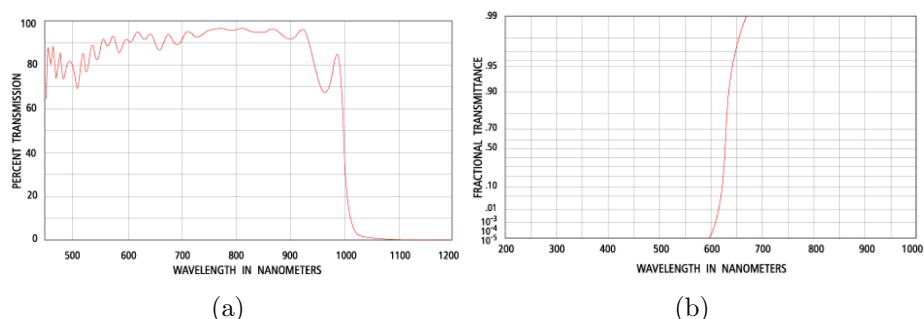


FIG. II.13: **Transmission des filtres utilisés pour la détection**

- (a) Filtre anti-1064 nm avant les diodes
- (b) Filtre rouge placé dans le condenseur

Il convient d'utiliser une source de lumière pour cette mesure ayant une forte émission entre 600 et 1000 nm. Ce n'est pas vraiment le cas des lampes au mercure; nous utilisons donc une lampe au xénon, qui a un spectre beaucoup plus riche dans cette zone (Fig. II.15(a)). La lumière issue de cette lampe emprunte le chemin standard d'illumination en fond clair du microscope. Lorsque nous utilisons cette illumination, nous voulons éviter de dégrader les fluorophores éventuellement présents dans l'échantillon étudié. Nous voulons donc éliminer les longueurs d'onde correspondant au domaine d'excitation de l'Alexa 594. Un filtre passe-haut de longueur d'onde de coupure 600 nm (F_1 , 03FCG501/RG610, Melles Griot) est donc placé à cet effet dans le condenseur. Sa caractéristique est donnée par la Fig. II.13(b).

2.4 En-dessous de 400 nm

Le domaine UV est dédié à la libération *in situ* de composés cagés. Nous utilisons un laser UV continu (375 nm, 7 mW, Oxixius), envoyé vers l'objectif par un miroir dichroïque passe-haut à 45° (D_1 , FM04, Thorlabs) de longueur d'onde de coupure 525 nm (Fig. II.14).

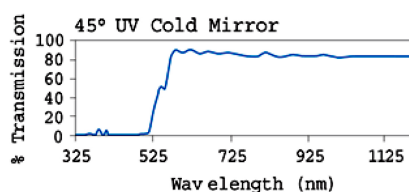
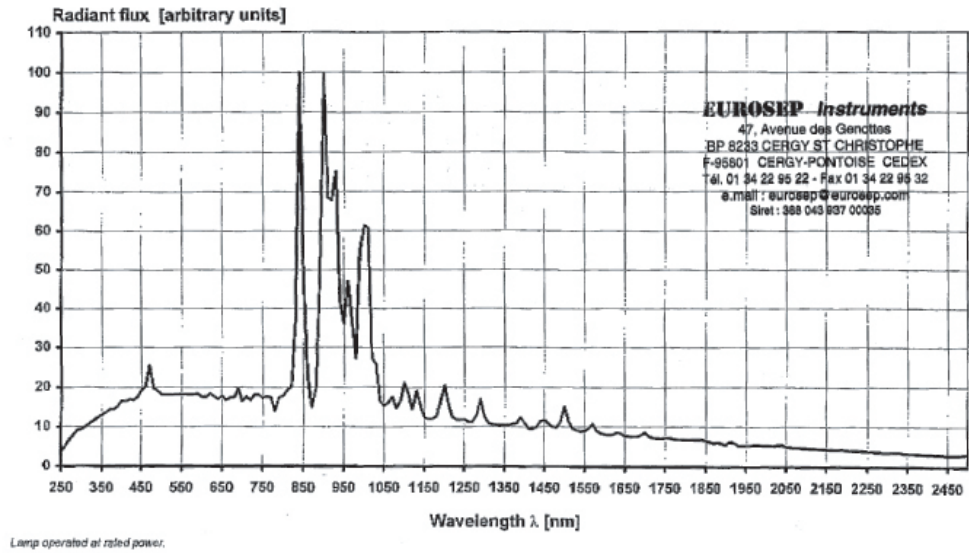
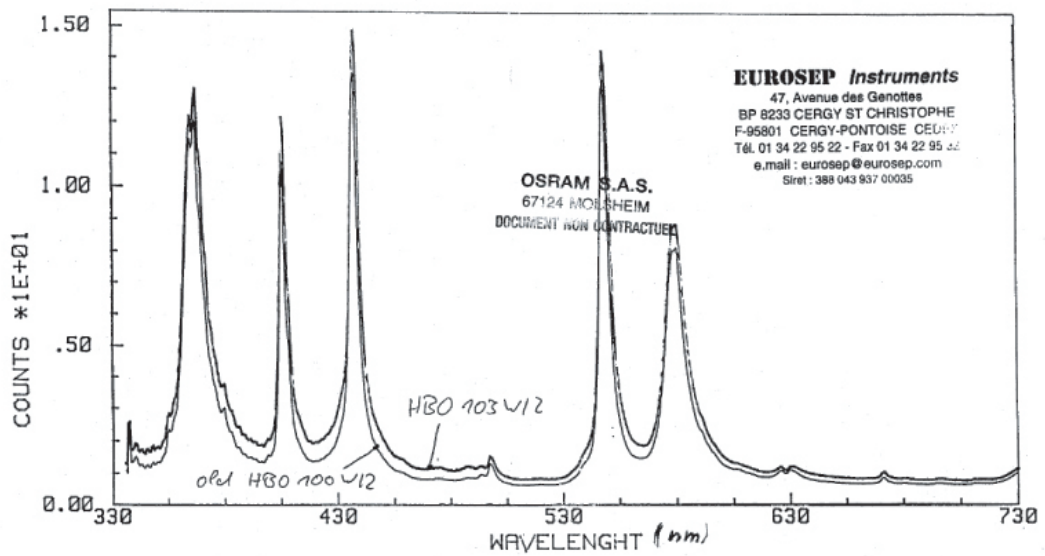


FIG. II.14: **Transmission spectrale du miroir dichroïque UV**

Ce miroir sert à coupler le laser UV avec le microscope



(a)



(b)

FIG. II.15: Spectres d'émission des lampes utilisées

(Fournis par la société Eurosep Instruments)

(a) Lampe au xénon (XBO150W/4)

(b) Lampe à vapeur de mercure (HBO103W/2)

3 Système de détection

Pour mesurer l'activité de moteurs moléculaires, il faut être capable de mesurer le mouvement des billes auxquelles ils sont couplés avec une résolution de l'ordre du nanomètre. Remarquons que les billes qui nous servent de rapporteurs du mouvement des moteurs moléculaires sont elles-mêmes des objets browniens soumis, à ces échelles à d'importantes fluctuations. Par exemple, considérons une bille retenue dans un piège de raideur $k_T \simeq 0,1 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. En vertu du théorème d'équipartition de l'énergie, la valeur quadratique moyenne de ses fluctuations de position vaut

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_T}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T la température. En injectant les valeurs numériques, on trouve à 300 K :

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = 6,4 \text{ nm.}$$

La résolution de la mesure des déplacements d'origine moléculaire est donc fortement bruitée par le mouvement brownien de la bille, qui est inévitable. Il convient cependant de s'assurer que les autres sources de bruit (vibrations, bruit électromagnétique...) sont d'importance moindre.

3.1 Choix de la technique de détection

Plusieurs techniques ont été développées par différents groupes. Elles sont toutes de nature opto-électronique, c'est-à-dire qu'on recueille sur un photodétecteur la lumière d'un faisceau lumineux ayant interagi avec la bille. Elles diffèrent sur la nature du faisceau et sur la position du photodétecteur dans le chemin du faisceau.

La technique originelle, utilisée dès les premières expériences de molécule unique, consiste à éclairer le champ d'observation en lumière à large spectre et à projeter l'image de la bille, agrandie entre 100 et 1000 fois, sur une photodiode à quatre quadrants (Simmons et coll., 1996; Veigel et coll., 1998). Nous détaillerons plus loin comment le traitement des signaux obtenus permet de remonter à la position de la bille. L'avantage de cette technique est qu'elle permet la mesure du mouvement absolu de la bille dans les deux directions du plan de piégeage, et qu'en utilisant le système d'imagerie du microscope, elle est relativement simple à mettre en oeuvre. De plus, en utilisant autant de diodes qu'il y a de pièges, on peut mesurer simultanément le mouvement de plusieurs objets piégés. Son inconvénient est d'être très sensible aux vibrations et chocs mécaniques.

Un autre procédé plus élaboré, réminiscent de la technique de microscopie de contraste interférentiel différentiel (D.I.C.), a été développé et appliqué à l'étude de la sensibilité des cellules ciliées de l'oreille interne (Denk et Webb, 1990; Denk et Webb, 1989). Schématiquement, le laser de piégeage est séparé par un prisme de Wollaston en deux faisceaux de polarisations orthogonales, légèrement décalés latéralement dans le plan du piège, mais toujours avec un grand domaine de recouvrement.

Si l'objet piégé est bien centré, le déphasage qu'il induit entre les deux faisceaux est le même, et la différence de phase est nulle. S'il se déplace dans la direction définie par les centres des pièges, les déphasages induits sur les deux faisceaux ne sont plus identiques, et leur mesure par une méthode interférentielle donne un signal proportionnel au déplacement. Comme la grandeur à mesurer est un déphasage entre deux ondes, et non plus une grandeur mécanique, cette technique peut atteindre des sensibilités bien plus grandes que la précédente, car elle s'affranchit de tous les problèmes de vibrations mécaniques existant dans l'appareillage. En revanche, on ne peut mesurer de déplacement que dans une seule direction, et l'enregistrement de plusieurs objets dans des pièges différents, quoique réalisable, nécessite un appareillage plus compliqué. Séduisante par son principe, cette technique paraît donc assez inadaptée à nos besoins.

Une troisième possibilité serait d'utiliser la méthode dite "d'interférométrie dans le plan focal arrière"¹ (Allersma et coll., 1998). Il s'agit dans ce cas d'observer les variations d'intensité du laser IR dans le plan focal arrière d'un condenseur placé en aval de l'objectif, après que le faisceau a été diffracté par la bille. Pour mesurer ces variations, on fait l'image de ce plan sur une diode à quatre quadrants. Cette technique a, comme la première, l'avantage d'être bidimensionnelle ; mais dans le cas où on piège plusieurs objets, comme on récolte par le condenseur toute la lumière venant du plan de piégeage, on ne peut pas faire la différence entre les variations d'intensité induites par l'un ou l'autre des objets. Par ailleurs, telle que présentée dans (Allersma et coll., 1998), c'est-à-dire utilisant la même source de lumière pour le piège et la détection, elle ne permet que de mesurer les mouvements **relatifs** de la bille et du piège. Il s'agit donc en réalité d'une mesure directe de la force de rappel exercée sur la bille. Pour mesurer son mouvement absolu, il faudrait utiliser un autre laser, de longueur d'onde différente, qui devrait évidemment être focalisé au même endroit que le laser IR, et donc traverser les mêmes composants servant à définir la position du piège. Dans notre cas, il faudrait en particulier qu'il traverse les D.A.O., mais l'angle de déflexion induit étant dépendant de la longueur d'onde du rayonnement, on se trouve face à un problème difficile à résoudre.

3.2 Mise en oeuvre

Nous avons donc choisi d'adapter la première solution à notre dispositif. Obtenir l'image fortement agrandie des billes est assez aisé : l'objectif, combiné à la lentille de tube, produit déjà un grandissement de 60. Nous avons juste ajouté, au niveau d'une sortie latérale du microscope, une lentille supplémentaire de courte focale pour faire diverger assez rapidement le faisceau. Il suffit ensuite de placer les photodétecteurs à une distance adéquate pour obtenir un grandissement suffisant. Dans les expériences où la mesure simultanée du mouvement de deux billes est nécessaire, un simple miroir placé sur le chemin du faisceau permet de séparer l'image et d'envoyer

¹sous-entendu : du condenseur - cette formulation assez opaque au premier abord n'est que la traduction littérale par mes soins de l'expression "Back Focal Plane Interferometry" qu'on trouve dans la littérature

chaque bille sur un détecteur différent. En revanche, la partie électronique, destinée à recueillir, amplifier et traiter les signaux délivrés par les détecteurs, nécessite plus de précautions pour obtenir finalement la résolution souhaitée.

Les détecteurs que nous utilisons sont des photodiodes à 4 quadrants (S1557, Hamamatsu), dont la zone photosensible a un diamètre de 1 mm. Le principe de la mesure de mouvement par une telle photodiode est illustré Fig. II.16. Chaque

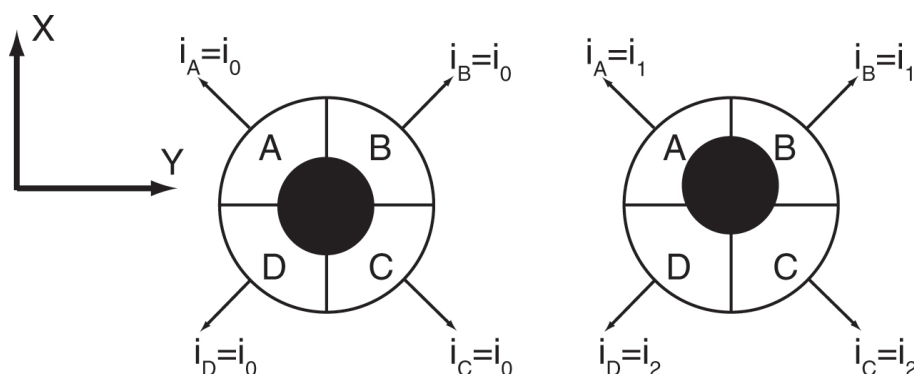


FIG. II.16: **Principe de la détection d'une bille par une diode à quadrants**

A gauche : lorsque la bille est centrée sur la diode, les quatre quadrants reçoivent un flux lumineux identique. Les signaux calculés comme indiqué (Eq. II.10 et Eq. II.11) sont nuls. A droite : le déplacement de la bille, ici dans la direction X, entraîne une asymétrie entre les quadrants supérieurs et inférieurs qui permet d'obtenir un signal proportionnel au déplacement.

quadrant de la diode se comporte comme une photodiode simple, c'est-à-dire produit un courant proportionnel au flux lumineux qu'il reçoit. On récupère les courants émis par les quatre quadrants identiques, et on accède au déplacement de la bille dans les deux directions du plan en effectuant les opérations suivantes :

$$X \propto (i_A + i_B) - (i_C + i_D) \quad (\text{II.10})$$

$$Y \propto (i_A + i_D) - (i_B + i_C) \quad (\text{II.11})$$

Les courants issus de la photodiode sont traités en deux étapes. Dans un premier temps, il sont convertis en tensions grâce à un premier circuit de préamplification, puis transmis par un câble blindé vers un deuxième circuit de traitement analogique effectuant les opérations suivantes, équivalentes à celles indiquées ci-dessus :

$$X \propto (u_A - u_C) + (u_B - u_D) \quad (\text{II.12})$$

$$Y \propto (u_A - u_B) + (u_D - u_C), \quad (\text{II.13})$$

qui permettent d'obtenir le mouvement de la bille piégée. La conception et le fonctionnement de ces circuits sont détaillés en annexe p. 180.

Ces deux signaux de position sont ensuite envoyés sur des fiches BNC isolées, où ils sont transmis à des amplificateurs différentiels sans gain avec une composante continue réglable. Ceux-ci ont pour fonction de compenser d'éventuelles tensions

continues de décalage dans les signaux. Avant d'être enregistrés sur ordinateur, les signaux sont filtrés par un filtre passe-bas anti-repliement (filtre de Bessel à huit pôles, modèle 3384, Krohn-Hite Corp.) dont la fréquence de coupure dépend de la fréquence d'acquisition choisie en aval. Des exemples d'enregistrements du mouvement d'une bille piégée sont donnés plus loin (Fig. II.24, p. 88).

Bien que nous ne l'utilisions pas de manière générale, le circuit de détection permet également de normaliser les signaux en les divisant par la somme totale des u_i ; cela permet de s'affranchir d'éventuelles fluctuations d'intensité lumineuse sur la diode. En pratique, les signaux obtenus sont davantage bruités, et l'usage nous a montré que cette précaution n'est pas fondamentale.

3.3 Détection en temps réel d'accrochages en molécule unique

Lors d'expériences à l'échelle de la molécule unique, il peut s'avérer utile de détecter en temps réel l'accrochage d'une myosine à l'actine afin d'agir dynamiquement sur la liaison ainsi formée et de mesurer des propriétés mécaniques ou chimiques du lien moteur-filament. Par exemple une technique de ce genre a été utilisée afin d'étudier la dépendance en fonction de la force extérieure de la cinétique du cycle de la myosine II (Veigel et coll., 2003). Nous avons inclus dans notre appareillage un dispositif semblable à celui présenté dans cette référence. Celui-ci, couplé à notre laser UV, permet virtuellement de libérer n'importe quelle molécule cagée au voisinage d'un moteur dès qu'il s'est accroché. En utilisant de la myosine 1c et du calcium cagé, on obtiendrait ainsi une configuration ressemblant à celle des stéréocils des cellules ciliées de l'oreille interne (*cf* chapitre I).

Description du circuit

La détection d'accrochages s'effectue en comparant en temps réel la variance du mouvement d'une bille piégée à un seuil fixé par l'expérimentateur. Nous utilisons un convertisseur analogique "rms-dc" (AD536A, Analog Device), qui délivre une tension continue égale à la valeur quadratique moyenne de son signal d'entrée. La sortie de ce convertisseur est envoyée à un comparateur simple (LM193, National Semiconductor), dont le seuil est fixé manuellement par un potentiomètre. La sortie du comparateur se comporte donc comme un signal logique (0 ou 5 V) qui peut servir de signal de déclenchement pour une autre tâche. Le masque du circuit imprimé réalisé est disponible en annexe (p. 187). Lorsqu'aucun moteur n'est accroché, la variance du mouvement de la bille est supérieure au seuil et la sortie du comparateur est à 0. Lorsqu'un moteur s'accroche, la variance du mouvement diminue, et le comparateur bascule à 5 V quand elle devient inférieure au seuil.

Performances

La figure II.17 illustre la réponse du circuit à un signal obtenu en expérience de molécule unique. Le délai entre le début de l'accrochage et le basculement du comparateur est déterminé à la fois par la valeur du seuil et par le temps d'intégration du

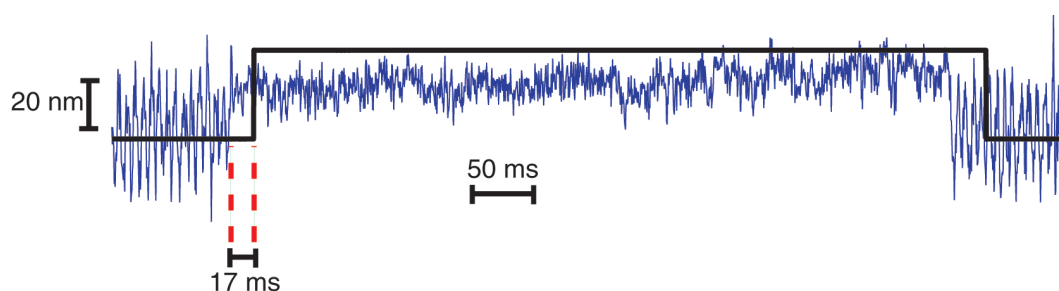


FIG. II.17: **Détection en temps réel de l'accrochage d'un moteur à un filament d'actine**

La variance de la position d'une des billes à l'extrémité du filament (signal bleu) présente une réduction caractéristique de l'accrochage. La sortie du comparateur (signal noir) bascule environ 17 ms après le début de l'accrochage.

convertisseur. Il est dans ce cas de l'ordre de 20 ms. Le choix d'une valeur plus élevée du seuil réduit ce délai, mais un seuil trop important augmente le risque de fausses détections. Si des délais bien inférieurs s'avèrent nécessaires, il faudra modifier le circuit afin de diminuer le temps d'intégration. Par ailleurs, il est indispensable de filtrer le signal de sortie du comparateur pour obtenir un signal de déclenchement propre. En effet, des fluctuations de la valeur rms du signal d'entrée autour du seuil peuvent causer des basculements multiples. L'utilisation d'un comparateur à hystérésis au lieu d'un comparateur simple permettrait d'éviter ce problème. C'est une des améliorations souhaitables de ce circuit.

4 Acquisition et génération de signaux

4.1 Matériel utilisé

L'enregistrement des signaux mesurés, ainsi que le pilotage des différents appareils à commande électronique du dispositif nécessitent l'utilisation de cartes d'acquisition et de génération de signaux. L'interface entre ces cartes et l'expérimentateur repose sur un programme écrit avec LabView 8 et LabView Real-Time (National Instruments). Nous utilisons trois cartes distinctes, qui se connectent chacune à un port PCI d'un ordinateur.

- Carte 1 (Série M PCI-6259, NI) : il s'agit d'une carte multifonctions; elle dispose de 32 voies numériques dynamiques, quatre sorties analogiques et 32 voies d'acquisition analogiques. Les voies analogiques sont codées sur 16 bits; les horloges de cadencement atteignent au maximum 2,8 MHz. Cette carte sert à piloter le synthétiseur de fréquence relié aux D.A.O. Chaque déflecteur requiert 15 voies numériques pour le codage de la fréquence de l'onde acoustique et une voie servant de bit d'activation, plus une sortie analogique pour déterminer l'amplitude de l'onde (*cf* p. 66).
- Carte 2 (PCI-MIO-16E-1, NI) : c'est une carte d'acquisition offrant 16 entrées analogiques 12 bits. Cette carte sert à enregistrer les différents signaux utiles

en vue d'une future analyse.

- Carte 3 (PCI-6733, NI) : carte de génération de signaux dotée de 8 sorties analogiques 16 bits. Cette carte commande tous les appareils autres que les D.A.O. nécessitant une commande électronique : la pédale du shutter, les translateurs piézoélectriques de calibration des photodiodes (*cf* p. 88), le laser UV.

Pour des raisons qui sont détaillées en annexe (p. 191), la carte 1 d'une part, et les cartes 2 et 3 d'autre part, se trouvent sur deux ordinateurs différents. Les cartes 2 et 3 sont par ailleurs reliées par un câble RTSI qui leur permet entre autres de partager des horloges de cadencement et des signaux de déclenchement de diverses tâches.

4.2 Architecture des programmes

Nous avons réparti les tâches point par point et avec buffer (*cf* annexe p. 191) sur deux machines distinctes. Le premier ordinateur (PC 1) tourne sous Windows XP et il exécute un programme écrit avec LabView ("Envoi.vi"). Ce programme pilote les cartes 2 et 3 décrites plus haut, qui ne sont utilisées qu'en mode avec buffer. L'acquisition de tous les signaux utiles (positions des billes, des pièges...) s'effectue donc sur cette machine. Elle gère également l'interface avec l'utilisateur, qui peut choisir d'effectuer une calibration ou l'un des différents protocoles possibles selon la mesure souhaitée. La plupart du temps, ces mesures impliquent le déplacement de la pince ; les informations utiles sont donc envoyées au deuxième ordinateur (PC 2) qui commande les déflecteurs.

Celui-ci utilise le système d'exploitation temps réel ETS permettant d'utiliser LabView Real-Time. Il pilote la carte multifonctions 1, qui fonctionne en mode point par point avec cadencement matériel. Deux programmes tournent simultanément sur ce système. Le programme de plus haute priorité ("Boucle génération.vi") est constitué d'une boucle cadencée assurant la génération point par point de la commande fréquentielle des D.A.O. sur les voies numériques de la carte, et de la commande d'amplitude sur deux sorties analogiques. Les commandes fréquentielles des deux D.A.O., qui déterminent la position de la pince, sont également envoyées vers deux sorties analogiques pour être acquises par le PC 1. Dans la boucle a lieu également l'acquisition des deux signaux de position de l'une des photodiodes. Un contrôleur PID numérique peut être enclenché pour asservir la position d'une bille piégée imagée sur cette photodiode. La consigne de ce PID (calculée par le PC 1) est aussi acquise sur une entrée analogique. La boucle itérative, les acquisitions et générations analogiques sont toutes synchronisées sur la même horloge, cadencée à 12 kHz².

Un détail mérite d'être souligné : les voies numériques ne supportent pas, pour des raisons de conception, le cadencement matériel en mode point par point ; on peut les utiliser pour générer du signal point par point, mais sans source de cadencement. Par conséquent, la génération d'un point sur les voies numériques n'est pas exactement synchronisée avec celle du point correspondant sur les voies analogiques. Cependant,

²Pour les expériences de molécule unique nécessitant deux pièges, la boucle tourne à 25 kHz, mais un seul des deux déflecteurs peut être commandé

dans la mesure où un point est envoyé à chaque itération de la boucle, le décalage entre les voies numériques et analogiques n'excède pas un échantillon dans le pire des cas. La situation est en réalité plus favorable : les mesures que nous avons effectuées (Fig. II.18) montrent de manière reproductible que les voies numériques devancent les voies analogiques d'environ $15 \mu\text{s}$ seulement.

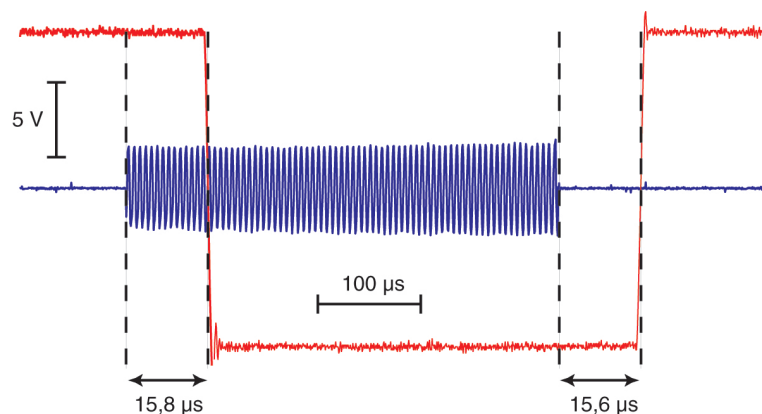


FIG. II.18: Mesure du décalage entre la génération de signal sur les voies numériques et analogiques

Une commande en créneau est envoyée à la fois sur les voies numériques vers le synthétiseur de fréquence et sur une sortie analogique de la carte (signal rouge). Le signal délivré par le synthétiseur de fréquence (signal bleu) passe donc brutalement d'une fréquence f_1 à une autre fréquence f_2 et vice-versa (Pour des raisons d'échantillonnage par l'oscilloscope, le signal de fréquence f_1 apparaît en fait continu, et le signal de fréquence f_2 apparaît ici avec une fréquence bien inférieure. Cela rend le basculement d'autant plus visible). Le basculement de fréquence se produit $15 \mu\text{s}$ avant le changement d'état du créneau.

Le deuxième programme que le PC 2 exécute ("Réception.vi") reçoit du PC 1 tous les paramètres nécessaires au calcul de la commande du piège (nature du mouvement, raideur du piège, constantes du PID ...). Il communique avec "Boucle génération.vi" par des FIFO³ Temps Réel afin de maintenir la vitesse d'exécution la plus rapide possible. Les deux machines sont reliées par leurs ports Ethernet et la transmission du PC 1 au PC 2 utilise le protocole UDP⁴. Contrairement au protocole TCP⁵, celui-ci ne nécessite pas, pour que la transmission soit réussie, que la machine réceptrice renvoie un signal attestant de la bonne réception des données. Il accapare donc moins de ressources de la part du PC 2, mais le risque de perte de données est accru. Cela peut être gênant pour la transmission de quantités importantes de données, mais ne pose pas vraiment de problème dans notre cas. Avec cette architecture la réactivité globale de l'interface est limitée par la transmission entre les deux machines, mais elle est d'environ 1 ms, qui est une valeur satisfaisante car les séquences de stimulation durent beaucoup plus longtemps.

³First In First Out

⁴User Datagram Protocol

⁵Transmission Control Protocol

4.3 Schéma récapitulatif

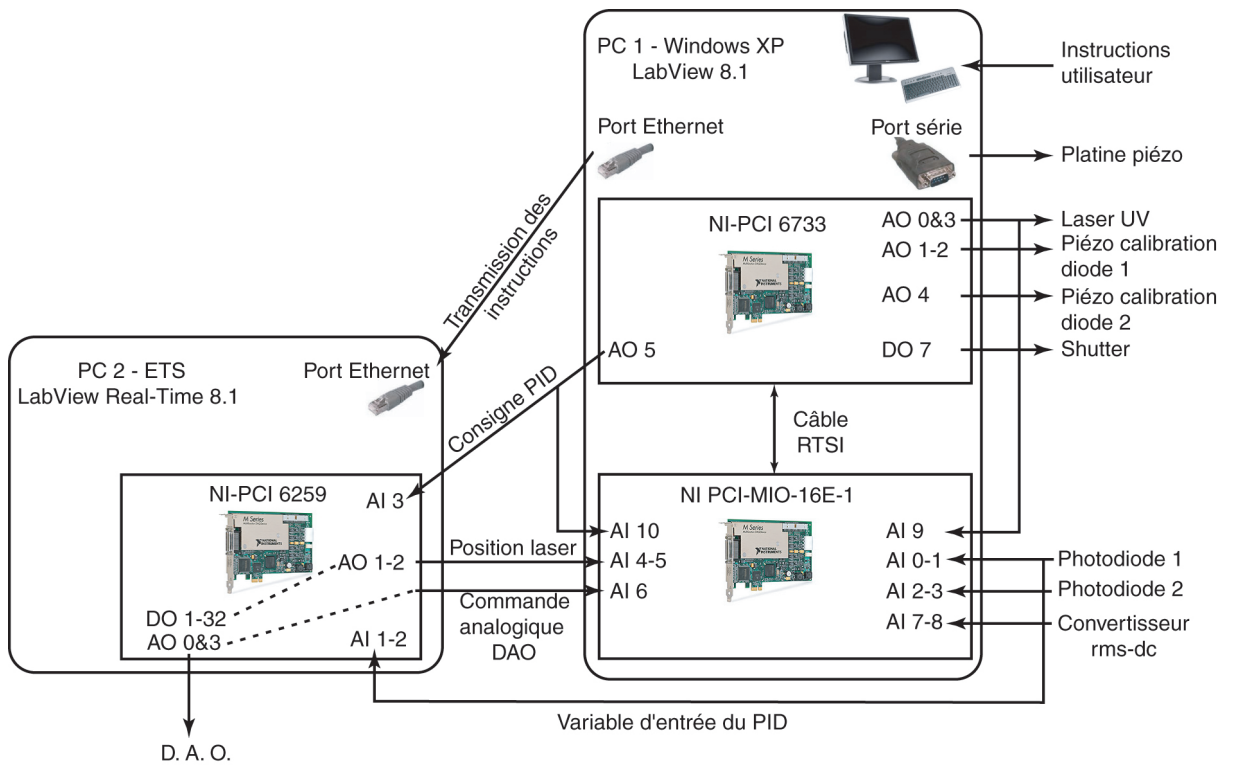


FIG. II.19: Attribution des tâches et interconnexions entre les deux ordinateurs pilotant l'ensemble du dispositif

(Nomenclature des voies sur les cartes PCI : DO=sortie numérique ; AO=sortie analogique ; AI= entrée analogique)

5 Procédures de calibration et performances

Dans cette section, nous décrivons les techniques de calibration que nous avons mises en oeuvre. Nous regroupons aussi, par souci de commodité d'utilisation, les figures donnant les performances des différents appareils.

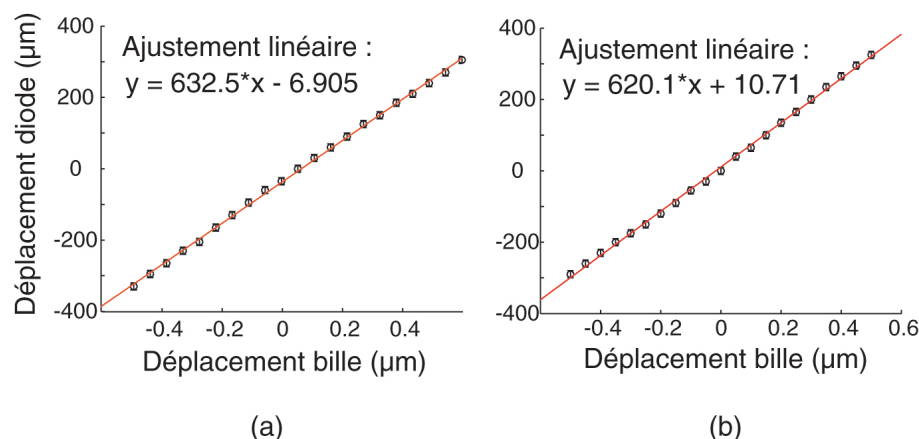


FIG. II.20: Mesure du grandissement optique

(a) Diode 1, direction X : $G = 633$

(b) Diode 1, direction Y : $G = 620$

5.1 Grandissement optique

Le grandissement optique entre le plan de piégeage et le plan des photodiodes est mesuré de la manière suivante. Une bille collée sur une lamelle est placée sur la platine du microscope et son image est recueillie sur une photodiode. On déplace la bille grâce à la platine piézoélectrique, puis on déplace la diode à l'aide d'un translateur micrométrique jusqu'à recentrer la bille sur la diode. Le déplacement de la diode est tracé en fonction du déplacement de la platine (Fig. II.20). La pente de la droite obtenue est égale au grandissement. On effectue cette calibration pour chacune des deux photodiodes.

5.2 Déflecteurs acousto-optiques

La calibration de chaque déflecteur consiste à déterminer la constante de conversion α d'une variation de la fréquence de commande en un déplacement du piège. Cette constante est obtenue comme suit. On centre l'image d'une bille piégée sur la photodiode 1, puis on déplace le piège en changeant la commande du déflecteur considéré. La diode est translattée jusqu'à ce que l'image de la bille soit à nouveau centrée. Connaissant le grandissement optique entre le plan du piège et la diode, on peut tracer le déplacement du piège en fonction de la variation de fréquence du déflecteur (Fig. II.21)

On obtient une droite de pente α . Cette procédure est répétée pour chaque déflecteur. L'exemple fourni ici donne $\alpha = 605 \text{ nm} \cdot \text{MHz}^{-1}$. Le pas minimal en fréquence

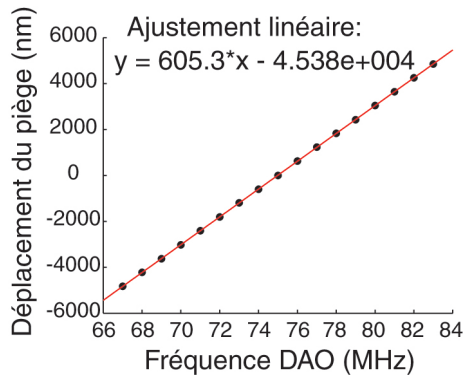


FIG. II.21: **Calibration des D.A.O.**

Exemple du déflecteur agissant dans la direction X : $\alpha = 605 \text{ nm} \cdot \text{MHz}^{-1}$

permis par le synthétiseur étant de 3,8145 kHz, on obtient une résolution en déplacement à l'aide du déflecteur de $605 * 3,8145/1000 = 2,3 \text{ nm}$ qui correspond à la valeur que nous avons estimée (p. 66).

5.3 Photodiodes

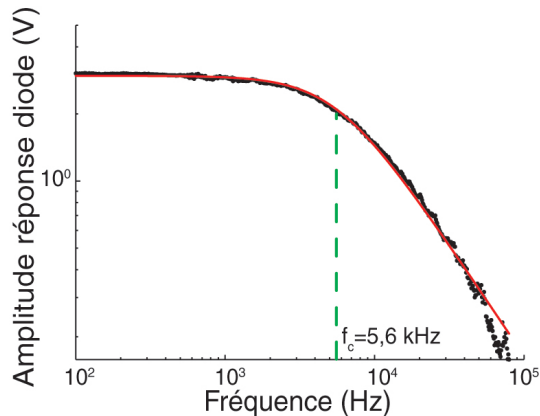


FIG. II.22: **Bande passante du système de détection**

La fréquence de coupure mesurée vaut 5,6 kHz

Bande passante

La bande passante du système de détection est mesurée en envoyant directement le laser IR sur la diode. La position du faisceau est modulée sinusoïdalement de 0 à 80 kHz. On trace l'amplitude du signal obtenu en fonction de la fréquence (Fig. II.22). L'ajustement sur cette courbe de la fonction de transfert d'un filtre passe-bas d'ordre 1 donne une fréquence de coupure à -3dB de 5,6 kHz. Cette valeur est identique pour les deux photodiodes. Elle correspond à un temps de réponse de

28 μs . Par comparaison, une bille de 1 μm de diamètre dans un piège de raideur $\kappa \simeq 0,1 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ a un temps caractéristique $\tau = 6\pi\eta R/\kappa = 90 \mu\text{s}$. Lorsque des moteurs moléculaires sont couplés à la bille, même avec des pièges plus raides, les temps de réponse mesurés sont supérieurs à cette valeur et atteignent plusieurs centaines de μs .

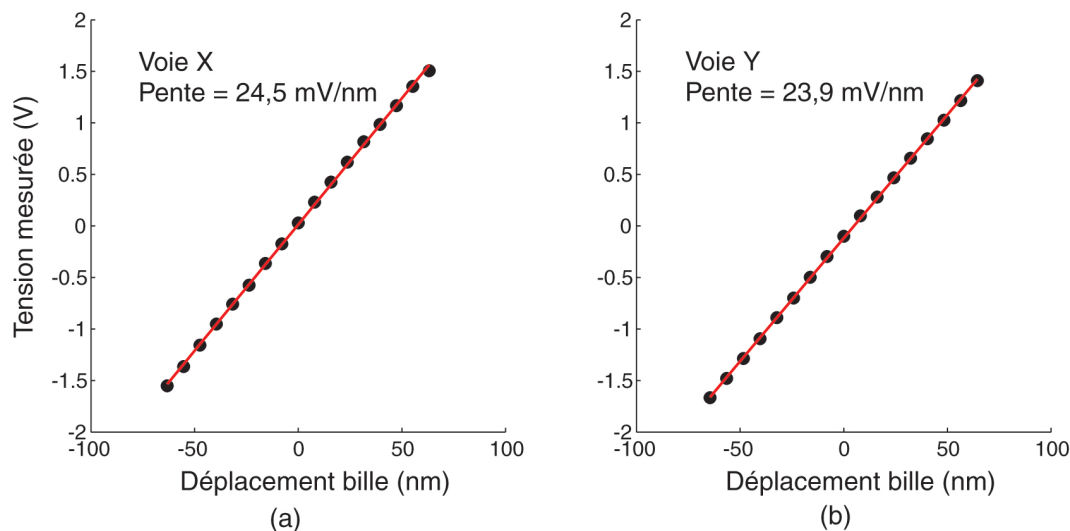


FIG. II.23: Exemple de calibration de la diode 1

(a) Dans la direction x : $c_x = 24,5 \text{ mV} \cdot \text{nm}^{-1}$

(b) Dans la direction y : $c_y = 23,9 \text{ mV} \cdot \text{nm}^{-1}$

Calibration

Lorsqu'une bille piégée est projetée sur une des diodes, le circuit de traitement délivre deux tensions proportionnelles au déplacement de la bille dans chaque direction. Pendant les expériences, chaque nouvelle bille donne lieu à une nouvelle calibration pour mesurer les constantes de conversion tension/déplacement. La photodiode 1 est montée sur une platine de translation piézoélectrique deux axes. On applique selon chaque axe une série de marches alternées d'amplitude croissante, et on mesure la variation de tension résultante. Connaissant le grandissement optique entre la diode et la bille piégée, on peut convertir le mouvement de la diode par rapport à la bille (fixe) en un mouvement équivalent mais virtuel, dans le plan de piégeage, de la bille par rapport à la diode. On trace pour chaque marche la valeur moyenne de la tension en fonction de l'amplitude du mouvement (virtuel) de la bille (Fig. II.23). La pente de la droite donne le coefficient de conversion.

La photodiode 2 n'est utilisée que pour les expériences de molécule unique. Dans ces expériences, nous ne mesurons que les déplacements dans la direction du filament d'actine, qui coïncide avec la direction d'un des axes de la diode. Celle-ci n'est donc pas montée sur une platine de translation bidimensionnelle comme la première, mais sur un translateur piézoélectrique uniaxe. La procédure de calibration selon cette

direction est identique à celle de la photodiode 1. Les coefficients de calibration des diodes sont en général compris entre 20 et 30 mV · nm⁻¹.

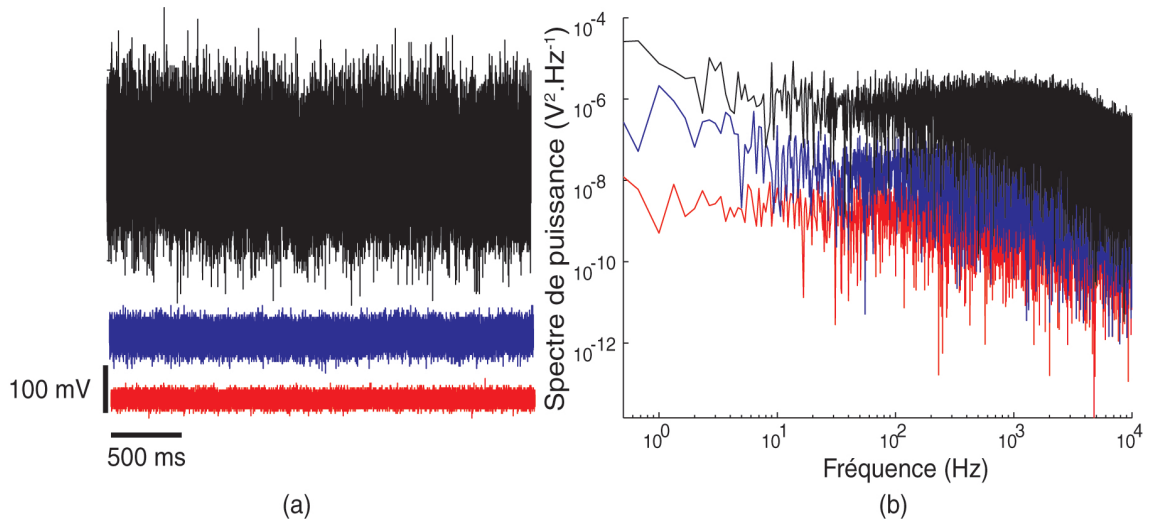


FIG. II.24: **Résolution de la mesure de position**

(a) Noir : signal obtenu avec une bille piégée à la raideur maximale ($\sqrt{\langle V^2 \rangle} = 74,5$ mV)

Bleu : signal obtenu sans bille ($\sqrt{\langle V^2 \rangle} = 17,8$ mV)

Rouge : signal obtenu sans lumière ($\sqrt{\langle V^2 \rangle} = 8,9$ mV).

(b) Spectres de puissance correspondants

La figure II.24 montre que sans bille, la valeur quadratique moyenne du signal délivré par le circuit vaut moins de 20 mV. On atteint bien une résolution virtuellement inférieure au nanomètre, même si, comme nous l'avons déjà discuté, la mesure de mouvements de la bille d'origine externe, qu'il s'agisse de déplacements du piège ou de mouvements actifs de moteurs moléculaires, reste bruitée par les fluctuations browniennes intrinsèques de la bille.

Linéarité

Le signal de sortie du circuit des photodiodes n'est proportionnel au mouvement de la bille que sur une certaine gamme de déplacement. Pour déterminer cette zone de linéarité, on projette une bille piégée sur une diode et on impose au piège un déplacement en dents de scie de grande amplitude dans l'une des deux directions du plan (Fig. II.25). L'expérience montre qu'il y a peu de différences entre les deux directions. Le signal obtenu est proportionnel au déplacement de la bille sur une zone de ± 150 nm autour de la position où la bille est centrée sur la diode.

5.4 Piège optique

Modélisation

Un piège optique exerce sur la bille une force de rappel. C'est par ce biais qu'on peut effectuer des mesures de force sur des systèmes biologiques. Encore faut-il être

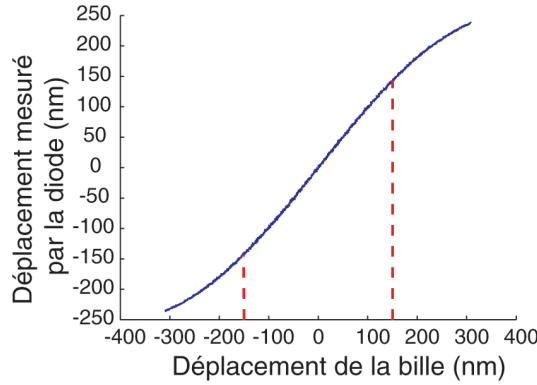


FIG. II.25: **Mesure de la zone de linéarité de la diode**

La courbe est une moyenne de 20 déplacements en dents de scie imposés par un D.A.O. et enregistrés sur la diode 1. Les lignes rouges délimitent la zone ± 150 nm au-delà de laquelle la diode n'est plus linéaire.

capable d'estimer cette force de rappel. L'interaction entre un objet diélectrique polarisable de taille r et un rayonnement électromagnétique focalisé dans une zone de dimension a est relativement aisée à décrire théoriquement dans les deux cas limites $r \ll a$ (régime de Mie, ou diffusion par un objet ponctuel) et $r \gg a$ (optique géométrique). Malheureusement, avec des lasers de longueur d'onde $\lambda = 1064$ nm, le point de focalisation, limité par la diffraction et donc typiquement de dimension $a \approx \lambda$, et les billes piégées de diamètre $1 \mu\text{m}$, sont exactement du même ordre de grandeur. Dans ce cas, le calcul de la force de rappel exercée par les forces de gradient sur le dipôle induit est beaucoup plus complexe. Bien que des travaux soient menés pour déterminer des expressions exactes de ces forces (Rohrbach et Stelzer, 2002; Rohrbach, 2005), celles-ci sont en général très compliquées et difficiles à mettre en oeuvre expérimentalement. Il est plus pratique de considérer que pour des déplacements de la bille peu éloignés du centre du piège (quelques centaines de nm), on peut développer l'expression de la force de rappel au premier ordre, ce qui revient à la modéliser par une force élastique (Fig. II.26).

Dans une direction donnée, la direction x par exemple, la force exercée par le piège s'écrit alors

$$\vec{F} = k_T (\Delta - X) \vec{e}_x \quad (\text{II.14})$$

où Δ et X sont respectivement la position du piège et de la bille. En plus de ces deux grandeurs la mesure de force implique donc de connaître la constante de raideur k_T du ressort. Les procédures de calibrations du piège que nous allons décrire visent à déterminer les raideurs équivalentes dans les deux directions du plan, en mesurant le spectre de puissance des fluctuations de la bille.

Equations du mouvement

Pour plus de simplicité, nous faisons ici un raisonnement selon une dimension, qu'il suffit de reproduire dans la deuxième. Le mouvement d'une bille micrométrique

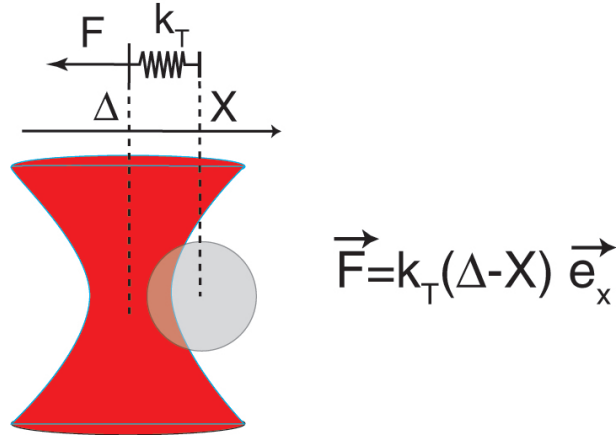


FIG. II.26: **Modélisation de la force exercée par le piège**

Pour de faibles déplacements, le piège est équivalent à un ressort de raideur k_T à déterminer

immergée dans une solution aqueuse correspond à un problème à bas nombre de Reynolds, et l'équation du mouvement s'écrit (Berg-Sorensen et Flyvbjerg, 2004) :

$$\gamma \dot{x}(t) + k_T x(t) = (2k_B T \gamma)^{1/2} \eta(t) \quad (\text{II.15})$$

où γ est le coefficient de friction visqueuse de la bille, et $(2k_B T \gamma)^{1/2} \eta(t)$ un bruit blanc gaussien qui représente les forces browniennes à la température T . η vérifie donc, pour tous t et t' :

$$\langle \eta(t) \rangle = 0 \quad \text{et} \quad \langle \eta(t) \eta(t') \rangle = \delta(t - t') \quad (\text{II.16})$$

En introduisant $f_c = k_T / (2\pi\gamma)$ et $D = k_B T / \gamma$, l'équation du mouvement devient :

$$\dot{x}(t) + 2\pi f_c x(t) = (2D)^{1/2} \eta(t) \quad (\text{II.17})$$

Si on enregistre $x(t)$ pendant une durée T_{exp} , on peut ensuite calculer la transformée de Fourier du signal pour les fréquences discrètes $f_n = n/T_{exp}$

$$\tilde{x}_n = \int_0^{T_{exp}} dt e^{2i\pi f_n t} x(t) \quad (\text{II.18})$$

qui, appliquée à l'Eq. II.17, donne

$$\tilde{x}_n = \frac{(2D)^{1/2} \tilde{\eta}_n}{2\pi (f_c - i f_n)}. \quad (\text{II.19})$$

Le spectre de puissance du signal mesuré s'écrit donc

$$P_n \equiv \frac{|\tilde{x}_n|^2}{T_{exp}} = \frac{D / (2\pi^2 T_{exp}) |\tilde{\eta}_n|^2}{f_c^2 + f_n^2}. \quad (\text{II.20})$$

En utilisant l'équation II.16, on obtient

$$\langle \tilde{\eta}_n^* \tilde{\eta}_l \rangle = T_{exp} \delta_{n,l}. \quad (\text{II.21})$$

La valeur moyenne du spectre de puissance est donc une fonction lorentzienne de la fréquence :

$$\mathcal{P}_n \equiv \langle P_n \rangle = \frac{D/(2\pi^2)}{f_c^2 + f_n^2}. \quad (\text{II.22})$$

Obtention de la raideur du piège

Si on estime à partir du spectre de puissance les paramètres f_c et D , on peut obtenir la raideur du piège $k_T = 2\pi k_B T f_c / D$ indépendamment du coefficient de friction qui peut dépendre fortement de la composition de la solution et de la distance à la surface de la lamelle.

Une méthode couramment utilisée consiste à moyenner N spectres et effectuer sur le spectre moyenné un ajustement d'une lorentzienne par la méthode des moindres carrés. Mais cette méthode de minimisation ne fournit l'ajustement exact que pour des données distribuées autour de leur moyenne avec une statistique gaussienne. Or, si les parties réelle et imaginaire $\Re(\tilde{\eta}_n)$ et $\Im(\tilde{\eta}_n)$ sont, séparément, gaussiennement distribuées, $|\tilde{\eta}_n|^2$ a une distribution *exponentielle* autour de sa valeur moyenne⁶, et d'après l'Eq. II.20 il en va de même pour le spectre de puissance. La méthode des moindres carrés induit donc une erreur systématique, qui varie comme $1/N$ (Berg-Sorensen et Flyvbjerg, 2004). Nous utilisons donc une autre méthode, proposée dans la même référence. Dans cet article, les auteurs montrent que la recherche des paramètres f_c et D donnant une lorentzienne qui minimise l'écart avec le spectre moyenné peut, si les données sont distribuées exponentiellement, être traitée analytiquement. Si \bar{P} est le spectre de puissance expérimental moyenné issu de N spectres indépendants, en introduisant les sommes $S_{p,q} = \sum_n f_n^{2p} \bar{P}_n^q$, les paramètres optimaux sont donnés par :

$$f_c = \left(\frac{S_{0,1} S_{2,2} - S_{1,1} S_{1,2}}{S_{1,1} S_{0,2} - S_{0,1} S_{1,2}} \right)^{1/2} \quad (\text{II.23})$$

$$D = \frac{2\pi^2 n}{n+1} \frac{S_{0,2} S_{2,2} - S_{1,2}^2}{S_{1,1} S_{0,2} - S_{0,1} S_{1,2}}. \quad (\text{II.24})$$

Il suffit donc de calculer 5 sommes ($S_{0,1}$, $S_{0,2}$, $S_{1,1}$, $S_{1,2}$, $S_{2,2}$) pour obtenir la raideur du piège.

⁶En effet, si $p[\Re(\tilde{\eta}_n) = a] \propto e^{-\frac{a^2}{2\sigma^2}}$ alors

$$\begin{aligned} p[\Re(\tilde{\eta}_n)^2 = b] &= p[\Re(\tilde{\eta}_n) = \sqrt{b}] + p[\Re(\tilde{\eta}_n) = -\sqrt{b}] \\ &\propto e^{-\frac{b}{2\sigma^2}} + e^{-\frac{b}{2\sigma^2}} = 2e^{-\frac{b}{2\sigma^2}} \end{aligned}$$

$|\tilde{\eta}_n|^2 = \Re(\tilde{\eta}_n)^2 + \Im(\tilde{\eta}_n)^2$ n'a donc pas une distribution gaussienne mais exponentielle

Procédure

Nous effectuons 20 acquisitions de 100 ms du signal de position de la bille piégée dans le piège à calibrer. Les spectres de puissance de ces acquisitions sont moyennés et, dans chaque direction, la raideur du piège est estimée à partir du meilleur ajustement à une fonction lorentzienne obtenu par la méthode analytique décrite ci-dessus (Fig. II.27(a)). Seules les fréquences comprises entre 10 Hz et 8 kHz sont prises en compte dans le calcul. La borne inférieure est imposée par le temps d'acquisition ; la borne supérieure par la bande passante de la photodiode.

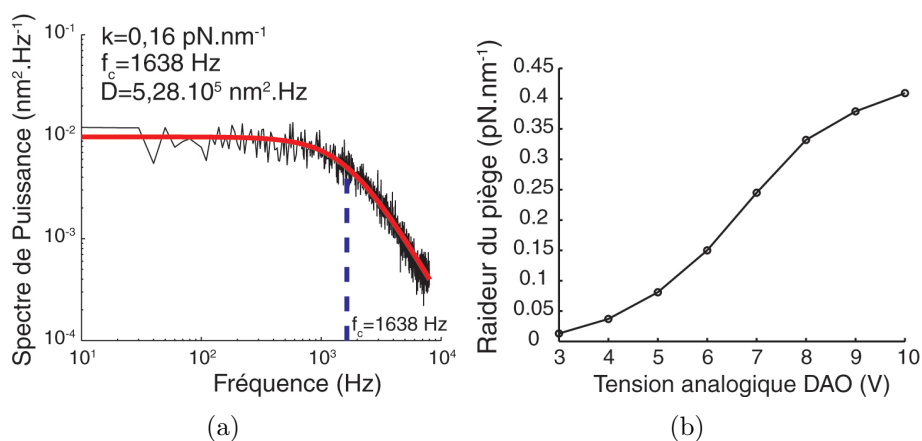


FIG. II.27: **Calibration du piège**

(a) Spectre moyenné (noir) du signal de déplacement obtenu sur la voie X de la diode 1 pour une tension analogique des D.A.O. de 6 V, et ajustement d'une fonction lorentzienne (rouge) obtenu par la méthode analytique.

(b) Variation de la raideur du piège en fonction de la tension analogique des D.A.O.

Nous avons vérifié que les valeurs de raideur obtenues par la méthode analytique et par des algorithmes d'ajustement utilisant la méthode des moindres carrés différent de moins de 2%. L'erreur induite par l'utilisation des méthodes standard n'est donc pas fondamentalement gênante ; l'avantage de la méthode analytique que nous utilisons réside dans sa rapidité : elle ne nécessite que des calculs simples au lieu d'algorithmes qui peuvent mettre quelques secondes à converger.

Nous pouvons ainsi aisément et à tout moment effectuer une calibration rapide du piège. La dépendance de la raideur du piège avec la tension analogique de commande des D.A.O. est illustrée Fig. II.27(b). Elle suit l'allure de la variation de puissance du laser à la sortie des D.A.O. en fonction de cette même tension (Fig. II.6). La puissance du laser à la sortie des défecteurs dépend aussi de la fréquence de commande (Fig. II.4), ce qui signifie que la raideur du piège peut varier quand on le déplace dans le plan focal de l'objectif. En pratique, on ne déplace pas une bille piégée sur des distances supérieures à la largeur de la zone de linéarité de la photodiode, qui vaut environ 300 nm. Un tel déplacement correspond à une variation de la fréquence de commande de l'un des défecteurs de 0,5 MHz, c'est-à-dire à une variation de puissance du laser de l'ordre de 1 à 2% selon la figure II.4. L'incertitude sur notre mesure de la raideur du piège est de toute façon du même ordre de

grandeur ; ce phénomène est donc négligeable.

6 Améliorations

Pour clore cette description exhaustive de l'appareil que nous avons développé, voici quelques idées d'améliorations qui le rendraient encore plus performant et adaptable à d'autres idées d'expériences que celles que nous avons effectuées jusqu'à présent.

A l'heure actuelle, nous mesurons des forces de manière indirecte, en soustrayant deux signaux de position, celui de la bille et celui du piège. Cela nécessite de mesurer ces signaux avec une grande précision, et de calibrer ces deux mesures indépendamment avec précaution. En particulier lorsque l'écart de position entre le piège et la bille est faible, donc quand on mesure des forces minimales, toute erreur de calibration peut fausser la valeur de force obtenue. Il serait intéressant de mesurer la force directement, sans traitement supplémentaire. La manière la plus simple de l'ajouter au système déjà existant serait d'utiliser la méthode de détection de la bille dans le plan focal arrière du condenseur en utilisant le laser infrarouge comme source de lumière (*cf* p. 80). Nous avons vu que cette technique donne une mesure de la position de la bille relativement au centre du piège, qui est exactement la grandeur dont nous avons besoin.

Un autre enrichissement intéressant serait d'adapter des systèmes microfluidiques à la platine du microscope afin, par exemple, de changer les compositions des solutions en cours d'expérience.

7 Tableau récapitulatif

Laser de piégeage	
Longueur d'onde	1064 nm
Puissance de sortie nominale	4 W
Diamètre en sortie des D.A.O.	900 μm
Diamètre à la pupille arrière de l'objectif	9 mm
D.A.O.	
Angle maximal de déflexion	49 mrad
Résolution angulaire	6,24 μrad
Efficacité de diffraction à $F_c = 75$ MHz	56%
Fréquence maximale de déflexion	>80 kHz
Objectif	
Grandissement	x 60
Ouverture numérique	1,35
Transmission à 1064 nm	$\simeq 50\%$
Transmission à 375 nm	75%
Diamètre de la pupille arrière	~ 8 mm
Distance focale	3 mm
Télescope	
Grandissement total	x 10
Mesure de position de billes	
Bande passante	5,6 kHz
Plage de linéarité	± 150 nm
Calibration	20 – 30 mV \cdot nm ⁻¹
Bruit sans lumière	9 mV rms ($\sim 0,5$ nm)
avec lumière	18 mV rms (~ 1 nm)
Piège optique	
Raideur	$\lesssim 0,4$ pN \cdot nm ⁻¹
Résolution en déplacement du piège	2,3 nm
Largeur de la gamme de déplacement	15 μm
Interface	
Cadencement max. de la boucle de génération du signal (2 déflecteurs)	12 kHz
Cadencement des D.A.O. pour double piège	25 kHz
Laser de décageage	
Longueur d'onde	375 nm
Puissance de sortie	7 mW max.

TAB. II.1: Tableau récapitulatif des caractéristiques et performances des différents éléments du montage.

B Protocoles biochimiques

Les protocoles que nous avons utilisés et que nous allons mentionner dans cette partie n'ont pour la plupart rien de révolutionnaire, et ont déjà été publiés et utilisés par de nombreux autres groupes. Il s'agit davantage de rassembler l'ensemble des recettes que nous avons utilisées pour les expériences que nous présentons dans ce travail. Si les protocoles sont détaillés, la composition des différents tampons (indiqués en gras) est en revanche donnée en annexe pour plus de lisibilité.

1 Polymérisation de l'actine

L'actine sous forme filamenteuse (actine F) est obtenue à partir de l'actine monomérique (actine G) par polymérisation dans un tampon à haute teneur en sel (**Tampon F**). Le marquage fluorescent qui permet de visualiser les filaments est obtenu en décorant les filaments par de la phalloïdine-alexa 594 (Invitrogen). Nous utilisons de l'actine G commerciale (Cytoskeleton) stockée à $42 \mu\text{M}$ ⁷ dans le **Tampon de stockage de l'actine** à -80°C ou de l'actine G provenant d'une purification effectuée dans un autre laboratoire (groupe de M.-F. Carlier) stockée à la même concentration et dans les mêmes conditions. Nous n'avons pas constaté de différence entre les expériences utilisant de l'actine de l'une ou l'autre provenance. L'actine biotinyllée que nous utilisons est d'origine commerciale (Cytoskeleton) et stockée dans le même tampon à $8 \mu\text{M}$.

1.1 Polymérisation d'actine F à $4\mu\text{M}$

Décongeler un aliquot ($2 \mu\text{L}$) d'actine G à $42 \mu\text{M}$ et ajouter $18 \mu\text{L}$ de **Tampon F**. Laisser polymériser à température ambiante 2h. Ajouter $1 \mu\text{L}$ de phalloïdine fluo (stockée à $100 \mu\text{M}$ dans du méthanol à -20°C) et homogénéiser avec précaution. Laisser sur glace pendant 1h.

1.2 Polymérisation d'actine biotinyllée 1 : 4

Le protocole est identique au précédent avec un mélange initial de $2 \mu\text{L}$ d'actine G à $40 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{L}$ d'actine biotinyllée à $8 \mu\text{M}$, et $16 \mu\text{L}$ de **Tampon F**.

2 “Heavy-MeroMyosin (HMM)”

Nous utilisons des HMM obtenues à partir de myosines II du muscle squelettique de lapin produites par le groupe du Professeur Matthias Rief (Physik Department, Technische Universität, München). A partir d'un aliquot de $1 \mu\text{L}$ à $6,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ décongelé, une solution stock est préparée en ajoutant $13 \mu\text{L}$ de **AB**. Dans cette solution conservée sur glace, les moteurs restent fonctionnels dans des proportions suffisantes pour donner des tests de motilité concluants pendant deux semaines.

⁷soit $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

La concentration de protéines est déterminée par une mesure de l'absorbance à 280 nm, avec un coefficient d'extinction $\epsilon_{\text{HMM}} = 0,60 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$, ce qui signifie qu'en utilisant une cuve de spectrométrie de 1 cm de large, la conversion absorbance-concentration s'effectue sur la base $0,6 \equiv 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3 Fonctionnalisation des billes

Toutes les expériences que nous avons effectuées nécessitent de coller des filaments d'actine à des billes destinées à être piégées. Nous avons utilisé deux techniques différentes pour y parvenir.

3.1 Avec des myosines-NEM

Le N-éthylmaléimide (NEM) (Fig. II.28) est un réactif dont l'effet sur les myosines II est de bloquer leur activité ATPasique sans pour autant modifier leur faculté d'accrochage à l'actine (Meeusen et Cande, 1979). Il réagit avec deux acides aminés cystéine du site ATPase de la myosine, directement impliqués dans l'accrochage du nucléotide. Les myosines-NEM sont donc un moyen efficace d'obtention d'un accrochage permanent à l'actine, et ce procédé a été largement appliqué dans ce but. Le protocole décrit ici est par exemple largement inspiré de (Veigel et coll., 1998).

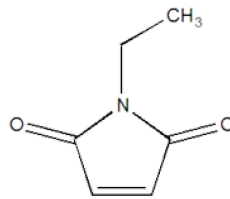


FIG. II.28: N-éthylmaléimide (NEM)

Nous utilisons pour cette préparation des myosines II entières commerciales (Sigma Aldrich) purifiées à partir du muscle de lapin. Elles sont conservées à une concentration de l'ordre de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution contenant en majorité du glycérol.

Transfert de tampon Décongeler un aliquot de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de myosines II entières et ajouter 1 mL d'eau déionisée. Vortexer. Centrifuger à 13000 rpm pendant 6 minutes ⁸. Pipeter et jeter le surnageant, et resuspendre le culot de myosines dans $100 \text{ }\mu\text{L}$ de tampon haut sel (**ABHS**), ce qui va désagréger les filaments. Mesurer la concentration de myosines en mesurant l'absorbance à 280 nm d'un échantillon dilué 10 fois (coefficient d'extinction $\epsilon_{\text{myoII}} = 0,53 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$). Elle devrait être de l'ordre de $5,5 - 6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Réaction avec NEM Préparer une solution fraîche de NEM à 100 mM en dissolvant 125 mg de NEM solide dans 10 mL d'eau déionisée. Ajouter $13 \text{ }\mu\text{L}$ de

⁸Les myosines précipitent en filaments épais et se déposent au fond du tube

cette solution à la solution de myosines. Vortexer et laisser réagir à température ambiante pendant 3h.

Arrêt de la réaction Ajouter 1 mL de DTT à 10 mM, vortexer et centrifuger à 13000 rpm pendant 6 minutes⁹. Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 100 μL de **ABHS**. Mesurer à nouveau la concentration, qui devrait être de 2,5 – 3,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Conserver sur glace, au maximum une semaine.

Préparation de billes propres Diluer 10 μL de billes en silice de 0,97 μm de diamètre (Bangs Lab.) dans 1 mL d'acide chlorhydrique concentré¹⁰. Laisser incubé sur rotateur pendant 1h30. Centrifuger à 8000 rpm pendant 2 minutes, jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 1 mL d'eau déionisée. Vortexer, centrifuger à nouveau. Resuspendre le culot dans 1 mL d'**ABHS**. Vortexer, centrifuger à nouveau. Resuspendre le culot dans 50 μL d'**ABHS** et vortexer.

Fonctionnalisation des billes par adsorption non spécifique Ajouter 90 μL de myosines-NEM à 50 μL de billes nettoyées. Ajouter également 10 μL de BSA fluo (BSA-Alexa 594, Invitrogen) à 0,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Vortexer, laisser incubé sur glace toute la nuit¹¹. Centrifuger le mélange à 8000 rpm pendant 2 min, et resuspendre dans 200 μL de tampon standard **AB**.

3.2 Avec le complexe biotine-streptavidine

Par rapport à l'utilisation des myosines NEM, l'utilisation de billes fonctionnalisées avec de la streptavidine et d'actine biotinylée a l'avantage de la rapidité et de la simplicité, puisque tout le matériel nécessaire est disponible commercialement. Nous avons déjà détaillé la polymérisation d'actine F biotinylée (p. 98). Nous utilisons d'autre part des billes de silice de 1 μm de diamètre sur lesquelles est greffée de manière covalente de la streptavidine (Bangs Lab.). Ces billes sont utilisables telles quelles, mais nous ajoutons juste une étape pour les rendre fluorescentes.

Marquage des billes streptavidine Prélever 10 μL de billes et les diluer dans 1 mL de **AB**. Centrifuger à 8000 rpm pendant 2 minutes. Jeter le surnageant, et resuspendre le culot dans 90 μL de **AB**, puis ajouter 10 μL de BSA fluo à 0,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Laisser incubé sur rotateur pendant 2h à température ambiante. Centrifuger de nouveau, et resuspendre le culot dans 700 μL de **AB-BSA**.

3.3 Mesure de la raideur des liens bille-actine

Quel que soit le type d'attachement utilisé, le lien formé entre la bille et le filament d'actine n'est malheureusement pas infiniment rigide. Dans une expérience typique, il existe donc un ressort en série entre la bille piégée et le ou les moteur(s) interagissant avec le filament. Ce ressort est de plus sujet à une grande variabilité

⁹même principe que précédemment

¹⁰Veiller à prendre les précautions qui s'imposent.

¹¹Quoique cela puisse paraître étrange, l'expérience prouve que le couplage myosines-billes est plus efficace lorsqu'on laisse la solution sans agitation que sur rotateur

d'un système à l'autre. On peut néanmoins estimer l'ordre de grandeur des raideurs mises en jeu de la manière suivante. En appliquant un protocole très similaire à celui utilisé pour les expériences de molécule unique (*cf infra* p. 109), un filament d'actine est suspendu entre deux billes piégées et mis sous tension. Cette tension peut être mesurée à partir de l'écart de l'une ou l'autre des billes par rapport au centre de son piège. On impose une modulation sinusoïdale à 150 Hz à l'une des deux billes, qui est transmise à la deuxième par le filament tendu. En mesurant la position des deux billes, on peut estimer l'allongement δx de l'ensemble ainsi que la force δf imposée par la modulation ; on en déduit la raideur série totale de l'assemblage bille-actine-bille $k_L = \delta f / \delta x$, qui est non linéaire et dépend de la tension dans le filament. Il est à noter que cette valeur n'est pas nécessairement la raideur d'un lien. La raideur totale mesurée inclut la combinaison série de la raideur longitudinale du filament, et de deux liens qui ne sont pas a priori rigoureusement identiques. La figure II.29 montre la comparaison des résultats obtenus avec des accrochages myosine-NEM et des accrochages biotine-streptavidine.

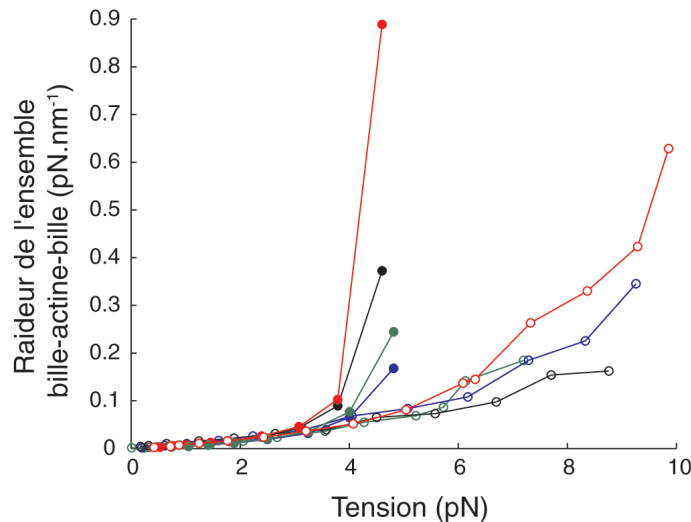


FIG. II.29: **Raideur série d'un accrochage bille-actine-bille en fonction de la tension du filament**

Comparaison des données obtenues avec des myosines NEM (ronds pleins) et des complexes biotine-streptavidine (ronds blancs). Dans les deux cas, on observe une variabilité importante d'une expérience à l'autre.

Le domaine de tension exploré est évidemment limité par la tension maximale que peuvent supporter les liens bille-actine avant de se rompre. La première observation est que les liens biotine-streptavidine (BS) supportent des tensions plus importantes que les myosines-NEM. 5 pN est le (grand) maximum supportable par les myosines-NEM, alors que les liens BS peuvent subir jusqu'à près de 10 pN. Dans un cas comme dans l'autre, la raideur mesurée devient non-linéaire à proximité de la tension maximale. La non-linéarité se manifeste vers 3 – 4 pN pour les myosines-NEM et elle semble plus importante que pour la BS, où elle apparaît vers 6 – 7 pN. En-deçà

de 3 pN, les deux types d'attachement produisent des résultats similaires. Il faut également noter qu'à part tout près du seuil de rupture, les raideurs mesurées sont bien inférieures à $0,6 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, qui est la raideur moyenne d'accrochage actine-myosine (Veigel et coll., 1998). C'est pourquoi la présence de cette raideur série a des effets non négligeables sur nos mesures.

En ce qui concerne les myosines-NEM, nos résultats sont similaires à ceux de (Veigel et coll., 1998). Ces auteurs mesurent par une méthode voisine de la nôtre la raideur d'un lien myosine-NEM, en négligeant la contribution de l'actine, et en considérant que les deux liens sont identiques. Ils obtiennent un comportement également non-linéaire et des valeurs très proches des nôtres. Une étude de la rupture de liaisons biotine-streptavidine par AFM (Florin et coll., 1994) montre une relation force déplacement linéaire, c'est-à-dire une raideur constante (Fig. II.30). Il est donc possible que la non-linéarité que nous observons dans le cas de la BS, et qui est moins importante que dans le cas des myosines-NEM, soit dûe au filament d'actine lui-même.

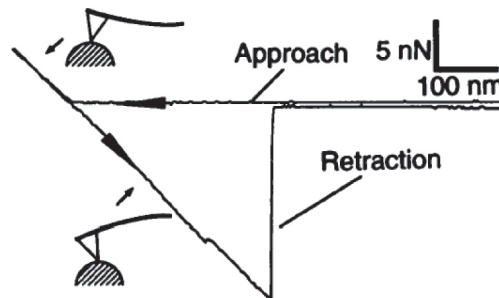


FIG. II.30: **Relation force-extension de liaisons biotine-avidine**

Mesure de la déflexion d'un cantilever d'AFM solidaire d'une pointe présentant des molécules d'avidine au contact d'une bille d'agarose biotinylée. Lorsqu'on étire les liaisons, la relation force-extension est linéaire. Comme le nombre de molécules sur lequel on tire n'est pas connu, on ne peut pas déterminer avec précision la raideur d'un lien biotine-streptavidine unique. D'après (Florin et coll., 1994).

4 Fixation des protéines sur les lamelles de verre

Afin de fixer les HMM sur la surface d'une lamelle de microscope en verre, nous recouvrons celle-ci d'un film de nitrocellulose. Pour cela, nous préparons une solution de nitrocellulose à 0,1% (masse/volume) dans un solvant organique volatil, l'amylacétate. Une goutte de 20 μL de cette solution est déposée sur une lamelle de 20x20 mm^2 , puis est répartie uniformément sur la surface de la lamelle en inclinant celle-ci dans toutes les directions. On laisse ensuite évaporer le solvant pendant environ 1h30. Les lamelles ainsi préparées sont utilisables une journée.

Pour déposer un tapis de moteurs sur un film de nitrocellulose, une solution de moteurs est mise au contact de la lamelle pendant 4 minutes à température

ambiante. Les sites d'accrochage encore disponibles sont passivés par exposition au tampon **AB-BSA** pendant à nouveau 4 minutes.

Nous avons vérifié, par des mesures de microscopie à force atomique (avec l'aide de Simon Scheuring, de l'UMR 168, Institut Curie), l'homogénéité des surfaces ainsi préparées. A la fin de la formation du film de nitrocellulose, la surface présente des bulles, mais les intervalles entre les bulles sont très homogènes (Fig. II.31(a)). Après le dépôt des moteurs, la surface est encore plus homogène (Fig. II.31(b)). A la résolution de la méthode utilisée ici (9 nm), aucune inhomogénéité n'est observée (Fig. II.31(c)).

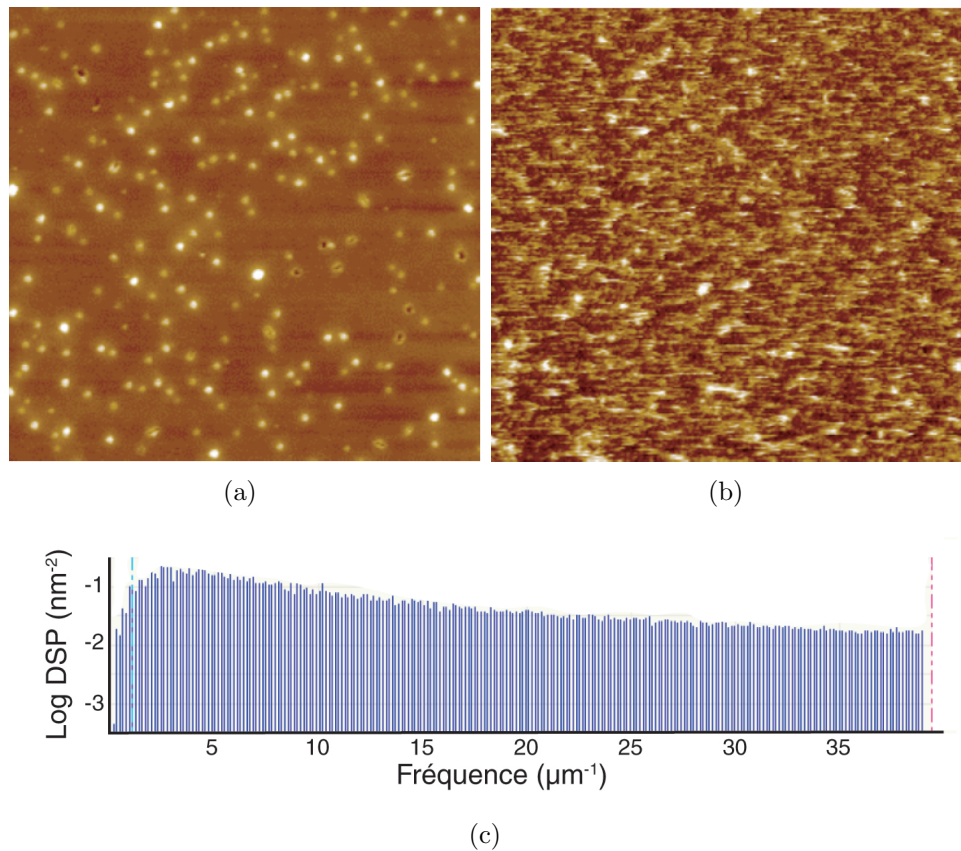


FIG. II.31: **Homogénéité des surfaces préparées visualisées par AFM**

(a) Après formation du film de nitrocellulose. La taille moyenne des bulles observées ici est de 20,9 nm.

(b) Après le dépôt d'un tapis de HMM dans les conditions expérimentales usuelles pour les expériences sur les moteurs collectifs.

(c) Densité spectrale de puissance de l'image (b). La décomposition en fréquences spatiales sur une ligne horizontale montre une distribution quasi-constante jusqu'aux plus hautes fréquences mesurées ($f_{\max} = 35 \mu\text{m}^{-1}$ ce qui donne une résolution de 9 nm).

Images d'AFM réalisées par Simon Scheuring.

L'étude en AFM d'une rayure volontaire sur une surface préparée avec un tapis de HMM montre que l'épaisseur typique du tapis est de 20 nm (Fig. II.32).

En règle générale, nous ajoutons également des billes de silice de diamètre 2,3 μm

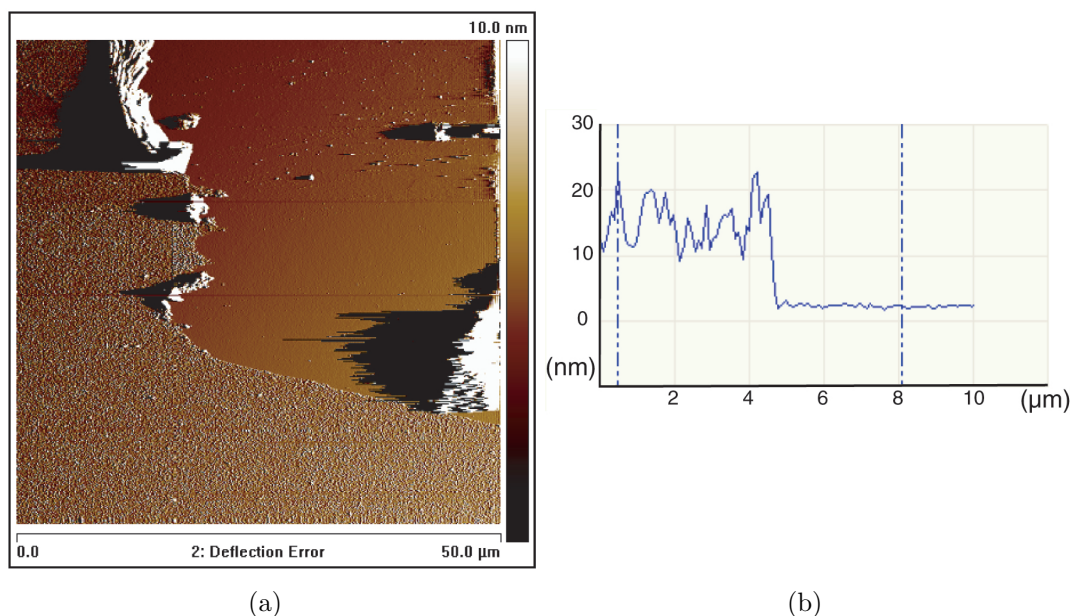


FIG. II.32: Mesure de l'épaisseur du tapis de HMM à proximité d'une rayure

(a) Observation en AFM de la topographie de la surface au voisinage de la rayure
 (b) Profil topographique le long d'une ligne perpendiculaire à la frontière entre les deux zones

(Bangs Lab.) dans la solution de nitrocellulose. Elles se déposent également sur la lamelle, ce qui permet de repérer aisément la position de la surface pendant les expériences. Ces grosses billes constituent également des piédestaux pour les expériences de molécule unique à 3 billes. Pour obtenir une densité confortable de billes, ajouter 10 μL de billes directement du stock à 10% (solution commerciale) dans 990 μL de solution de nitrocellulose. Vortexer, et disperser les billes par immersion dans un bain à ultrasons pendant 3x 10 minutes, en vortexant entre chaque bain. Avant chaque nouvelle préparation de lamelles, il est préférable de soniquer de nouveau pendant 10 minutes.

5 Libération d'ATP cagé

Dans certaines expériences, nous déclenchons la production de mouvement par les HMM en libérant de l'ATP en solution. Pour cela, nous incluons dans la solution un ATP cagé, le DMNPE-ATP (Invitrogen, Fig. II.33). L'ATP est lié, au niveau de son troisième groupe phosphate, à un autre groupe chimique, ce qui le rend non hydrolysable.

Cette liaison peut être rompue par l'absorption de photons UV, ce qui libère l'ATP pleinement fonctionnel en solution. Nous avons choisi le DMNPE-ATP car son maximum d'absorption, à 351 nm, est proche de la longueur d'onde de notre laser UV (375 nm).

Pour illustrer le déclenchement de motilité par l'application de lumière UV, un

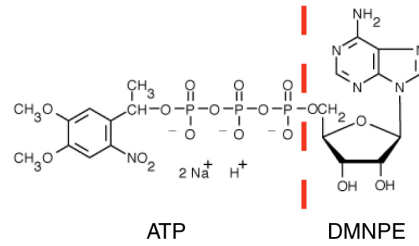


FIG. II.33: Adénosine 5'-triphosphate, P3-(1-(4,5-diméthoxy-2-nitrophenyl)éthyl) ester, sel disodique (DMNPE-ATP)

film serait idéal. Mais comme il s'agit d'un format peu approprié pour un manuscrit, nous montrons Fig. II.34 les états initial et final d'une telle expérience.

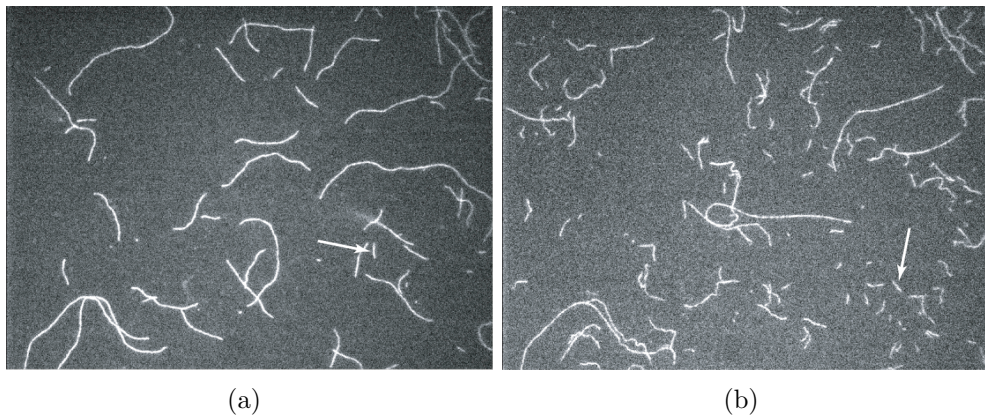


FIG. II.34: **Test de motilité en présence de DMNPE-ATP**
 (a) Avant l'application de lumière UV, les filaments sont longs et fixés sur des HMM à l'état *rigor*
 (b) Après exposition à l'UV les filaments ont été déplacés (comme en témoigne le filament repéré par une flèche); ils ont également subi des ruptures caractéristiques des tests de motilité *in vitro*.

6 Cocktails enzymatiques annexes

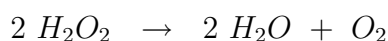
6.1 Consommateur d'oxygène

Le photoblanchiment est un problème qui perturbe toute observation en fluorescence. Ce phénomène désigne la propriété statistique de tout fluorophore de perdre sa capacité d'émission après un certain nombre de cycles d'absorption/émission. L'état excité du fluorophore permettant l'émission d'un photon est, tout comme son état fondamental, un état singulet de spin. La perte d'émission se produit lorsque, dans cet état excité, le fluorophore subit une transition non radiative vers un état triplet. Cet état ne peut plus se désexciter vers l'état fondamental par une transition électrique et il a donc une durée de vie moyenne beaucoup plus longue que l'état singulet.

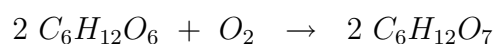
Une conséquence encore plus grave de ce phénomène en microscopie sur des systèmes biologiques, est que l'état triplet peut se transformer en des formes semi-oxydées ou semi-réduites du fluorophore, présentant des radicaux libres (Song et coll., 1995). Ces formes avec radicaux sont extrêmement réactives, en particulier avec l'oxygène dissous en solution, et de telles réactions causent la destruction du fluorophore, voire de la structure à laquelle il est attaché (dans notre cas des filaments d'actine). C'est pourquoi, sans précaution particulière, des filaments d'actine marqués en solution soumis à un éclairage excitateur continu se délitent en quelques secondes. Pour remédier à ce problème, on peut soit essayer de diminuer l'oxygène dissous, soit réduire la durée de vie de l'état triplet et des états radicalaires. En pratique, on ajoute aux solutions expérimentales un mélange "anti-photoblanchiment" destiné à agir sur les deux fronts. Il a été montré que le MEA (mercaptoéthylamine), un agent réducteur portant un groupe thiol diminue grandement le photoblanchiment en réduisant les états triplet et radicalaires (Song et coll., 1996). De manière équivalente, on trouve aussi dans la littérature l'utilisation de β -mercaptoéthanol, ou de DTT, à l'odeur moins épouvantable. Pour réduire la concentration en oxygène dissous, on utilise un mélange de deux enzymes : la glucose oxidase et la catalase. La glucose oxidase catalyse l'oxydation du glucose par l'oxygène en acide gluconique selon la réaction suivante :



La catalase sert à éliminer le peroxyde d'hydrogène formé, qui est toxique. Cette enzyme catalyse l'autodismutation de l'eau oxygénée :



Cette dernière réaction produit à nouveau de l'oxygène, mais par le jeu des coefficients stœchiométriques, le bilan final s'écrit



et il est bien négatif en ce qui concerne l'oxygène.

Notre recette de mélange antiphotoblanchiment est inspirée de (Ishijima et coll., 1996; Veigel et coll., 1998).

Ce nouveau tampon (**AB-GOC**) est obtenu de la manière suivante : à 200 μL de **AB**, ajouter 20 μL de glucose oxidase à $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 20 μL de catalase à $1,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ et 10 μL de DTT à 1 M. Vortexer. Ce mélange ne se garde pas plus de 3h sur glace. Pour qu'il soit fonctionnel, il faut ajouter à ce mélange du glucose. Cela n'est fait que juste avant de démarrer l'expérience (*cf* p. 107).

6.2 Régénérateur d'ATP

Au cours d'une expérience, les moteurs consomment l'ATP, dont la concentration décroît. On aimerait pourtant pouvoir garder ce paramètre constant, en particulier pour les expériences en molécule unique. Par nature, ces expériences sont effectuées

à très faibles concentration d'ATP (de l'ordre de quelques μM) afin de rendre les accrochages des moteurs à l'actine plus longs et donc plus facilement détectables. Il est dans ces conditions fondamental de recycler l'ATP consommé, sans quoi la quantité initiale d'ATP est très rapidement épuisée et l'expérience doit s'arrêter. On utilise pour cela la créatine phosphokinase, une enzyme qui, à partir d'ADP et de créatine phosphate, produit de l'ATP.

Le tampon contenant le mélange consommateur d'oxygène et le mélange de recyclage de l'ATP (**AB-GOC-CP**) est obtenu de la manière suivante : à 180 μL de **AB**, ajouter 20 μL de glucose oxidase à $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 20 μL de catalase à $1,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10 μL de DTT à 1 M, 12,5 μL de créatine phosphate à 40 mM et 7,5 μL de créatine phosphokinase à $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Vortexer. Ce mélange ne se garde pas plus de 3h sur glace. Le glucose et l'ATP ne sont ajoutés qu'au dernier moment avant de démarrer l'expérience (*cf* p. 107).

7 Déroulement typique d'une expérience

7.1 Moteurs en comportement collectif

Préparation d'une chambre

Une lamelle de microscope est traitée sur la moitié de sa surface seulement par une solution de nitrocellulose dans l'amylacétate avec des billes en silice de $2,3 \mu\text{m}$ de diamètre en suspension, comme indiquée p. 102. Une lame de microscope est coupée à 4,9 cm, dimension imposée par la platine de positionnement de notre microscope, puis nettoyée à l'acétone et séchée avec un Kimwipes. Lame et lamelle sont assemblées à l'aide d'adhésif double face (modèle MacBond, MacTac) pour former une chambre d'injection ouverte aux deux extrémités (Fig. II.35). La séparation entre la zone traitée et la zone non traitée de la lamelle se situe à peu près au milieu de la chambre.

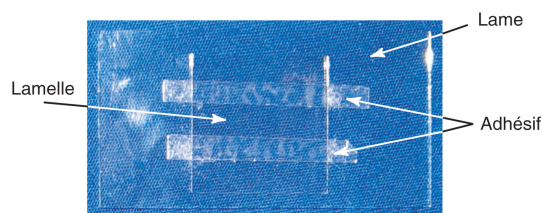


FIG. II.35: Un exemplaire de chambre d'injection

Fixation des HMM

La solution de HMM pour l'injection est obtenue en diluant 2 μL de solution stock de HMM (*cf* p. 98) dans 5 μL de **AB**, pour atteindre une concentration finale de $140 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cette solution est injectée dans la chambre du côté traité de la

lamelle. On laisse les HMM se déposer pendant 4 minutes. La chambre est ensuite rincée avec 20 μL de **AB-BSA** qu'on laisse agir pendant encore 4 minutes.

Incubation de l'actine et des billes fonctionnalisées

On prépare une solution de filaments d'actine biotinylés en diluant 2 μL d'un aliquot stock polymérisé à 4 μM (*cf* p. 98) dans 45 μL de **AB** additionné de 5 μL de phalloïdine non marquée à 100 μM dans un mélange eau 50%-méthanol 50%. Le mélange qui va être injecté pour l'expérience est préparé comme suit : dans 80 μL de **AB-GOC-CP** (*cf* p. 106), diluer 3 μL de billes streptavidine¹² (*cf* p. 99), 4 μL de glucose à 230 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ et 2 μL d'ATP à 100 mM. Vortexer, puis ajouter 10 μL d'actine diluée. Homogénéiser doucement avec un cône de pipette, puis laisser incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 minutes.

Injection du mélange expérimental et début de l'expérience

Lorsque la chambre est prête, on injecte 20 μL de mélange billes-actine, puis la chambre est fermée à l'aide de vernis à ongles et fixée sur la platine du microscope. En fluorescence, on vérifie que les moteurs sont fonctionnels et provoquent la motilité de filaments d'actine libres sur la surface. Ensuite, on cherche une bille liée à un filament d'actine. Lorsqu'une telle bille est piégée, on centre son image sur la photodiode en étant assez près, si possible, de la surface¹³. On calibre la photodiode puis le piège ; on rapproche ensuite avec précautions la bille de la surface jusqu'à observer le développement d'une force due aux moteurs (Fig. II.36).

Cette procédure peut être répétée pour plusieurs billes, et le nombre de billes testée dépend de la qualité de la préparation et de la chance de l'expérimentateur. En effet, les billes ont tendance à se coller assez rapidement sur la surface. Après quelques dizaines de minutes, il devient plus rare de trouver encore des billes libres en solution.

Pour une raison que nous n'expliquons pas, c'est en général au-dessus de la zone non traitée par la nitrocellulose et donc sans moteurs qu'on en trouve alors le plus facilement.

7.2 Expérience avec de l'ATP cagé

Le protocole est identique à celui décrit ci-dessus, à ceci près que le tampon final est **AB-GOC** et non **AB-GOC-CP**, car on ne veut pas dans ces expériences régénérer l'ATP consommé, et qu'on ajoute 2 μL de DMNPE-ATP au lieu d'ATP. Une fois sur le microscope, on ne peut évidemment constater de motilité avant d'allumer le laser UV. Quand une bille avec un filament est approchée de la surface, on vérifie qu'elle interagit avec des moteurs en déplaçant l'échantillon relativement

¹²Si on utilise des billes NEM, il faut utiliser de l'actine non biotinylée, et une solution diluée 10 fois dans **AB** de billes NEM préparées comme indiqué p. 99 et soniquée pendant 1 minute

¹³Il faut faire attention à ce que le filament à ce stade ne soit pas attrapé par des moteurs

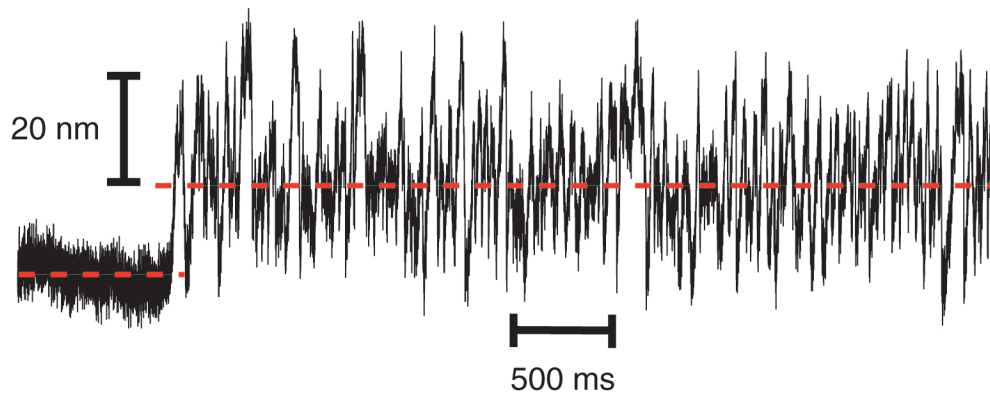


FIG. II.36: **Apparition de l'activité due aux moteurs**

Le décalage de valeur moyenne entre la section de mouvement brownien de la bille centrée dans le piège et la section de mouvement induit par les moteurs indique le développement d'une force active.

au piège grâce à la platine piézoélectrique et en contrôlant si cela provoque un déplacement de la bille dans le piège.

7.3 Expérience en molécule unique

A quelques modifications près, essentiellement la concentration de moteurs et d'ATP, le protocole qui est décrit ici ressemble beaucoup à celui indiqué pour les expériences de comportement collectif. Nous le reproduisons néanmoins dans son intégralité afin que cette section puisse être éventuellement utilisée de manière indépendante du reste du manuscrit.

Préparation d'une chambre

Une chambre d'injection est préparée comme indiqué précédemment, mais avec une lamelle traitée à la nitrocellulose sur toute sa surface (Fig. II.35).

Fixation des HMM

La solution de HMM pour l'injection est obtenue en diluant 1 μL de solution stock de HMM (*cf* p. 98) dans 100 μL de **AB**, pour atteindre une concentration finale de protéines de $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cette solution est injectée dans la chambre et on laisse les HMM se déposer pendant 4 minutes. La chambre est ensuite rincée avec 20 μL de **AB-BSA** qu'on laisse agir pendant encore 4 minutes.

Incubation de l'actine et des billes fonctionnalisées

On prépare une solution de filaments d'actine en diluant 2 μL d'un aliquot stock polymérisé à 4 μM (*cf* p. 98) dans 45 μL de **AB** additionné de 5 μL de phalloïdine

non marquée à $100\ \mu\text{M}$ dans un mélange eau 50%-méthanol 50%. On prépare également une solution diluée de billes NEM en diluant $10\ \mu\text{L}$ de billes préparée comme indiqué p. 99 dans $100\ \mu\text{L}$ de **AB-BSA**. Cette solution est immergée dans une cuve à ultrasons pendant 1 minute.

Le mélange qui va être injecté pour l'expérience est préparé comme suit : dans $80\ \mu\text{L}$ de **AB-GOC-CP** (*cf* p. 106), diluer $3\ \mu\text{L}$ de billes NEM, $4\ \mu\text{L}$ de glucose à $230\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $2\ \mu\text{L}$ d'ATP à $100\ \mu\text{M}$. Vortexer, puis ajouter $10\ \mu\text{L}$ d'actine diluée. Homogénéiser doucement avec un cône de pipette, puis laisser incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 minutes.

Injection du mélange expérimental et début de l'expérience

Lorsque la chambre est prête, on injecte $20\ \mu\text{L}$ de mélange billes-actine, puis la chambre est fermée à l'aide de vernis à ongles et fixée sur la platine du microscope. Loin de la surface de la lamelle, on cherche une bille liée à un filament d'actine. Lorsqu'une telle bille est piégée, on cherche une deuxième bille à piéger pour accrocher l'autre extrémité du filament.

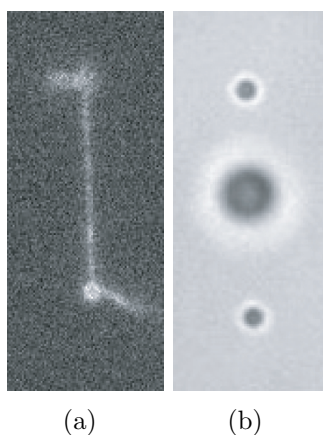


FIG. II.37: Différentes étapes d'une expérience de molécule unique

(a) Un filament est accroché entre deux billes NEM

(b) Le filament tendu est positionné à proximité d'une grosse bille servant de piédestal sur lequel est (potentiellement) accrochée une molécule de HMM

Lorsque les deux billes sont piégées, on applique un écoulement avec la platine de positionnement afin d'aligner le filament d'actine dans la direction de l'axe entre les deux pièges, jusqu'à ce qu'on voie en fluorescence qu'il est suspendu entre les deux billes (Fig. II.37(a)). La réussite de cette étape, indispensable pour la suite de l'expérience, dépend des capacités d'accrochage de la deuxième bille trouvée, et peut donc faire l'objet de plusieurs essais. A proximité d'une grosse bille collée à la surface, en illumination en fond clair et sans tendre le filament, on déplace les deux photodiodes pour centrer l'image de chaque bille sur la photodiode correspondante, puis on calibre les détecteurs. On calibre ensuite les deux pièges (avec la tension analogique de commande des D.A.O. à $6\ \text{V}$, ce qui produit des raideurs d'environ

$0,03 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$). Le filament est ensuite mis sous tension en éloignant un piège (Piège 2), le deuxième restant centré au même point (Piège 1). A l'aide de la platine piézoélectrique, le filament est approché du piédestal (Fig. II.37(b)) jusqu'à ce que des accrochages d'une molécule de HMM soient observés sur les signaux de position des billes (Fig. II.38). Si la recherche s'avère infructueuse, on peut essayer de nouveau autour d'un piédestal voisin.

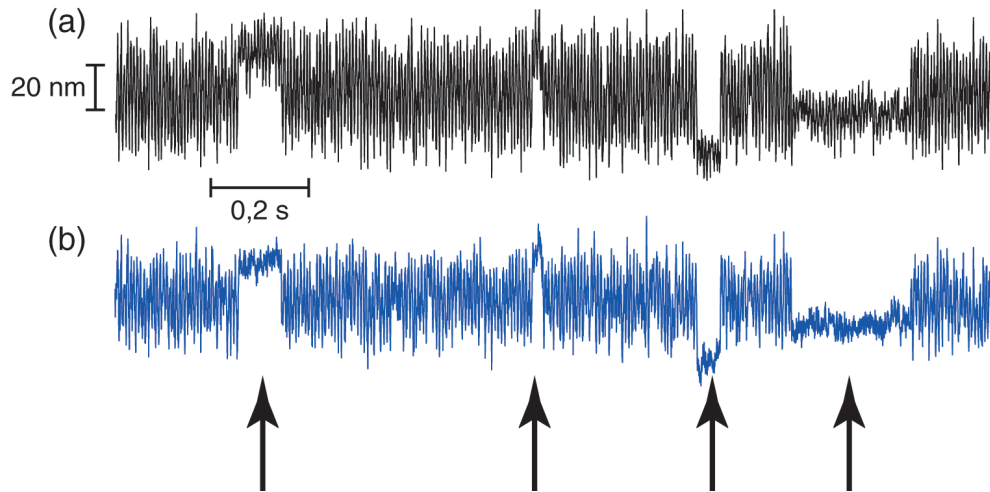


FIG. II.38: **Observation d'interactions HMM-actine en molécule unique**

Enregistrements du mouvement des billes dans la direction du filament. (a) Bille dans le piège 1. (b) Bille dans le piège 2. Lorsqu'une HMM s'accroche au filament, la rigidité du système augmente et la variance des signaux diminue significativement, et la valeur moyenne des signaux est décalée (sections indiquées par les flèches noires).

La position du piège 1 est par ailleurs modulée sinusoidalement par les D.A.O. Cette modulation est transmise à la bille dans le piège 2 par le filament lorsqu'il est tendu. A chaque accrochage la transmission de cette modulation diminue, ce qui facilite la détection des accrochages lors de l'analyse des données, par une détection synchrone.

A cause des phénomènes lents de dérive, il peut être nécessaire de repositionner le filament de temps en temps pour continuer à observer des accrochages. Le talon d'Achille de cette expérience est la résistance de l'ensemble bille-actine-bille à la tension. En général, c'est la rupture du filament ou de l'accrochage à l'une ou l'autre bille qui impose l'arrêt des mesures. Il faut alors chercher un autre filament. Comme dans le cas des moteurs collectifs, plus la durée de l'expérience s'allonge plus il est difficile de trouver des billes qui ne soient pas collées à la surface.

Chapitre III

Comportement collectif des myosines II

A Assemblée de moteurs s'opposant à une force élastique

1 Principe des expériences

LE but de ces expériences est de reproduire *in vitro* une configuration similaire à celle qui intervient dans les sarcomères de fibres musculaires ou dans les touffes ciliaires des cellules ciliées. Il s'agit d'observer l'interaction d'un groupe de HMM avec un filament d'actine, soumis à une force de rappel élastique s'opposant à la force active des moteurs.

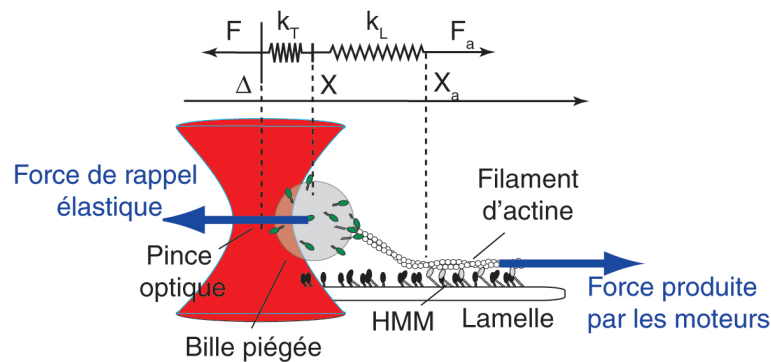


FIG. III.1: Schéma d'une expérience sur le comportement collectif des moteurs et notations adoptées

Le sens positif est conventionnellement défini comme le sens du mouvement du filament induit par les moteurs en l'absence de force extérieure. En conséquence, la force de rappel moyenne équilibrant la force des moteurs quand le piège est allumé est négative. k_T est la raideur de la pince, et k_L représente la raideur de l'élément élastique en série constitué du lien bille-actine et d'une portion du filament d'actine entre la bille et les moteurs. Δ , la position du piège, et X , celle de la bille, sont les deux grandeurs mesurées.

L'action collective des myosines sur l'actine en l'absence de force extérieure est typiquement ce qu'on observe dans un test de motilité standard. Dans les conditions expérimentales que nous utilisons, nous avons mesuré sur deux expériences la vitesse moyenne des filaments d'actine sans force extérieure. Les valeurs obtenues (Fig. III.2) sont situées dans la partie supérieure de la gamme des vitesses générées par des HMM mesurées *in vitro* (*cf* chapitre I), et sont élevées pour des mesures effectuées à température ambiante. Notons cependant que nous ne contrôlons pas la température au niveau des échantillons ; il est donc possible que l'illumination relativement intense sur l'échantillon, ainsi que le laser IR focalisé de la pince optique provoquent une augmentation locale de la température, ce qui contribuerait à augmenter les vitesses mesurées.

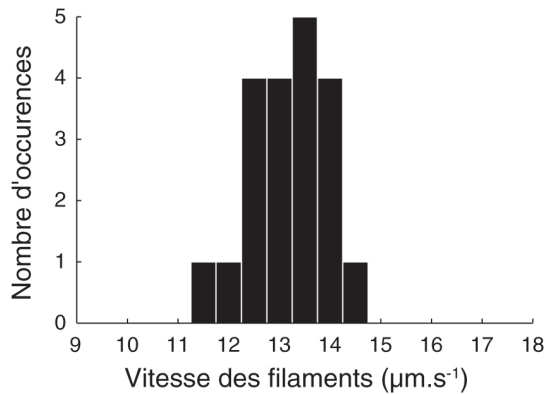


FIG. III.2: **Histogramme de la vitesse moyenne des filaments pendant une expérience de motilité *in vitro***

La vitesse de 20 filaments est mesurée par analyse d'images d'un film de la motilité des filaments. Pour chaque filament, l'évolution temporelle de l'extrémité guidant le mouvement est suivie manuellement d'une image à l'autre. La valeur moyenne de la vitesse (\pm déviation standard) est de $13,2 \pm 0,7 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Sur une autre expérience, nous avons mesuré $9,1 \pm 0,3 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$.

L'ajout principal de nos expériences consiste à utiliser une bille liée à un filament d'actine comme poignée pour manipuler le filament. Cette bille, piégée dans une pince optique, permet d'exercer sur le système actine-myosines la force de rappel désirée (Fig. III.1). L'instrumentation que nous avons à notre disposition, et dont nous avons détaillé la constitution dans le chapitre précédent, permet d'observer l'évolution spontanée d'un tel ensemble, mais aussi d'effectuer des mesures de sa réponse mécanique à différentes stimulations, en boucle ouverte ou avec une rétroaction sur la position de la bille. Dans la suite, un mouvement positif de la bille correspond à la direction du mouvement de la bille provoqué par les moteurs en l'absence de force extérieure.

2 Etude du mouvement spontané

2.1 Forme, amplitude, et fréquence

Lorsqu'une bille liée à un filament d'actine est piégée en solution, son mouvement se résume à des fluctuations browniennes autour du centre du piège. Si on l'approche de la surface, le filament peut commencer à interagir avec les moteurs. En présence d'ATP, cette interaction se caractérise par une modification qualitative du mouvement de la bille (Fig. III.3(a)). Si on remplace l'ATP par de l'ATP cagé, il devient possible de déclencher l'activité des moteurs, par photolyse de l'ATP cagé à l'aide d'un laser UV (Fig. III.3(d)). On observe l'apparition d'un mouvement similaire à celui obtenu en présence d'ATP.

L'activité des moteurs provoque une mise sous tension du filament, et le mouvement mesuré de la bille change sous trois aspects.

1. La ligne de base du signal se décale dans le sens positif : la bille s'éloigne en moyenne du centre du piège, ce qui indique le développement d'une force par les moteurs. Lorsque la force de rappel atteint la force d'arrêt de l'assemblée de moteurs, la ligne de base se stabilise. En connaissant la force produite par un moteur individuel, et le rapport de charge d'un moteur, on peut estimer à partir de la force d'arrêt le nombre de moteurs impliqués dans le mouvement actif observé. Il ne s'agit que d'une estimation grossière, dans la mesure où les valeurs précises aussi bien du rapport de charge que de la force par moteur sont des sujets de débat (*cf* chapitre I, p. 16). Le décalage de la ligne de base n'étant pas systématiquement enregistré, on ne peut pas mesurer la force d'arrêt des moteurs dans toutes les expériences. Les forces mesurées varient entre 4,7 et 22,3 pN ($n=10$). En prenant une force par moteur moyenne de 2,5 pN et un rapport de charge de 0,1 (Howard, 2001, Ch. 16), cette gamme de forces d'arrêt indique que les mouvements que nous observons mettent en jeu quelques dizaines de moteurs.
2. L'amplitude des fluctuations mesurées lorsque les HMM interagissent avec le filament est beaucoup plus importante que lorsque la bille et le filament sont libres. Les amplitudes pic-à-pic des déplacements obtenus¹ varient entre 10 et 80 nm, ce qui est bien supérieur à la valeur du pas d'une molécule individuelle (~ 5 nm), mesuré en molécule unique. Le tracé de la position de la bille dans un plan parallèle au plan de la surface (Fig. III.3(b)) montre également que ces fluctuations sont fortement anisotropes et définissent un mouvement unidimensionnel dans la direction du filament, par opposition aux fluctuations isotropes de la bille libre.

¹L'amplitude pic-à-pic des fluctuations est estimée comme $2\sqrt{2\langle X^2 \rangle}$, $\langle X^2 \rangle$ étant la valeur quadratique moyenne du déplacement de la bille. Ce calcul fournit l'amplitude exacte du signal si le déplacement est sinusoïdal

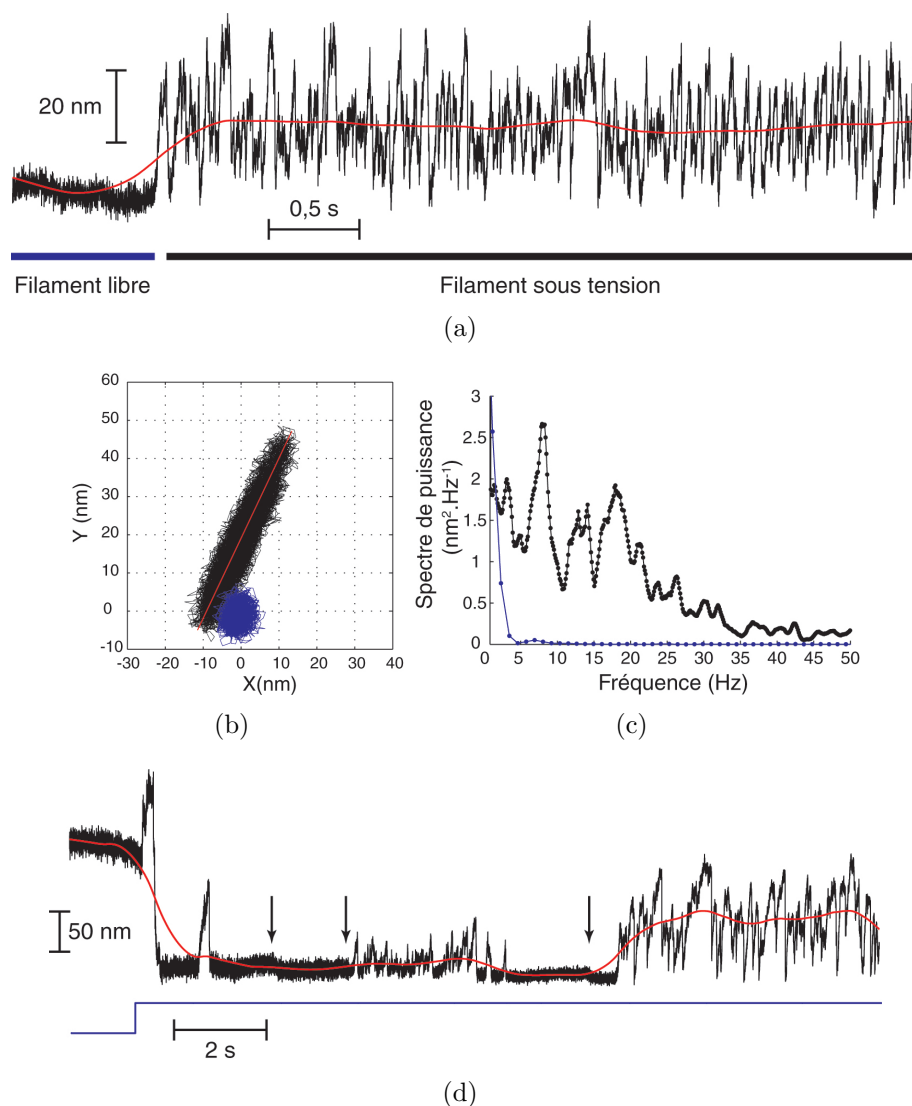


FIG. III.3: **Apparition du mouvement actif dû aux moteurs**

(a) Visualisation dans le domaine temporel du début de l'interaction moteurs-filament (noir) et de la ligne de base du signal (moyenne glissante sur 1 s, rouge). La force d'arrêt est de 6 pN, ce qui correspond à environ 25 moteurs impliqués (*cf* texte). Pendant l'interaction, l'amplitude des fluctuations est de 32 nm, bien supérieure à celle mesurée quand la bille est libre, qui vaut 7,3 nm.

(b) Tracé dans un plan parallèle à la surface du mouvement de la bille. Lorsque le filament est libre (bleu), le mouvement de la bille est isotrope. Lorsqu'il est en interaction avec les HMM (noir), la bille a un mouvement anisotrope quasi-unidimensionnel.

(c) Spectres de puissance du mouvement de la bille liée au filament libre (bleu) et en interaction avec les HMM (noir), lissés sur une fenêtre fréquentielle de 1 Hz.

(d) Déclenchement de l'activité des moteurs par photolyse de DMNPE-ATP. Le signal de déclenchement du laser UV est en bleu. Avant le déclenchement du laser UV, les moteurs sont attachés à l'état rigor au filament d'actine mis sous tension. Lorsque l'ATP est libéré en solution, on observe d'abord un relâchement abrupt de la tension dans le filament, correspondant au décrochement des moteurs. Après quelques sections sporadiques, un mouvement actif durable généré par les moteurs apparaît, avec des caractéristiques identiques à celles obtenues dans les expériences avec de l'ATP simple. Notons qu'au cours de l'enregistrement, la raideur du piège a été augmentée, aux instants indiqués par des flèches.

3. Le spectre de puissance des fluctuations pendant l'interaction avec les moteurs² n'est pas constant, comme l'est celui des fluctuations de la bille libre sur la même gamme de fréquences (Fig. III.3(c)). Cependant, le plus souvent, les fluctuations dues à l'activité des moteurs n'ont pas de cohérence de phase. Cette caractéristique, visible dans le domaine temporel, se traduit dans le spectre de puissance du signal par un contenu fréquentiel large bande, sans pic de fréquence bien défini, entre 0 et 40 Hz environ.

Dans le cas où le spectre de puissance présente un pic clair, nous avons ajusté sur ce spectre une fonction lorentzienne (Martin et coll., 2001). La fréquence centrale f_0 et la largeur à mi-hauteur Δf de la lorentzienne permettent de calculer un facteur de qualité $Q = f_0/\Delta f$, qui caractérise la cohérence de phase de l'oscillation, c'est-à-dire la précision avec laquelle on peut lui attribuer une fréquence. Les signaux à faible cohérence de phase donnent des pics larges, avec des facteurs de qualité faibles (Fig. III.4).

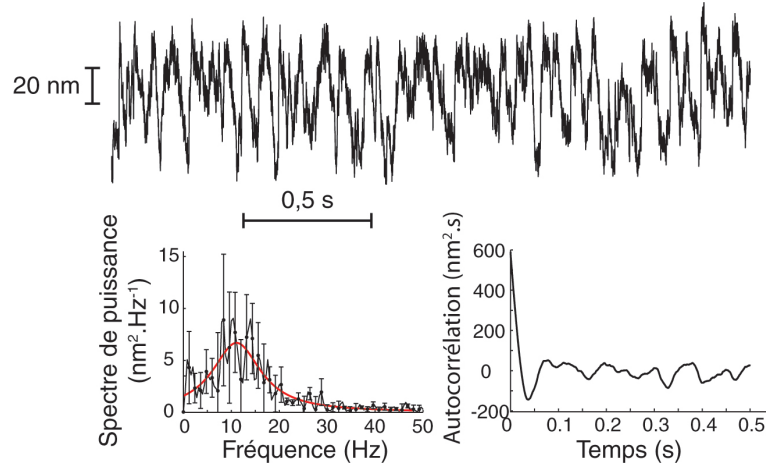


FIG. III.4: **Exemple d'oscillation non rythmique**

L'amplitude pic-à-pic vaut 44 nm. Le spectre de puissance du signal montre un pic large centré à 10,8 Hz et de facteur de qualité $Q = 0,8$. La fonction d'autocorrélation du signal $C(\tau) = \int X(t)X(t+\tau)dt$ illustre également la perte de cohérence sur une durée d'environ 70 ms

²Le spectre de puissance d'un signal $x(t)$ acquis pendant une durée T_{exp} est défini de la même manière qu'au chapitre 2 : par $P(f) = \frac{|\tilde{x}(f)|^2}{T_{\text{exp}}}$, où $\tilde{x}(f)$ est la transformée de Fourier à la fréquence f :

$$\tilde{x}(f) = \int_0^{T_{\text{exp}}} x(t)e^{2i\pi ft} dt.$$

Nous avons également observé dans certains cas ($n=14$) de “vraies” oscillations rythmiques, que nous définissons arbitrairement comme les signaux présentant un pic fréquentiel bien défini donnant un facteur de qualité supérieur à 1, et dont l’oscillation se maintient pendant une durée supérieure à 10 cycles. La figure III.5 en montre trois exemples représentatifs. Les fréquences observées varient entre 2 et 14 Hz. Dans certains cas, les oscillations ont une forme triangulaire asymétrique, présentant une phase lente dans la direction positive, celle du mouvement naturel des moteurs, et une phase rapide dans la direction opposée (Fig.III.5(a)). Ce type d’oscillation est donc semblable, en fréquence et en forme, aux oscillations de contraction observées dans les myofibrilles. Il est également possible d’obtenir une forme rectangulaire d’oscillation, semblable aux oscillations spontanées de touffe ciliaire (Fig. III.5(b)). Dans la situation la plus fréquente, les oscillations sont d’allure intermédiaire entre ces deux types, et ne présentent pas de forme clairement identifiable (Fig. III.5(c)).

Quels sont les paramètres qui déterminent la fréquence et la forme des oscillations? La raideur de l’élément élastique s’opposant aux moteurs pourrait jouer un rôle important. Nous avons essayé de modifier, sur une oscillation donnée, la raideur du piège, mais nous ne sommes pas parvenus à obtenir de résultats probants. Deux raisons peuvent expliquer cela : d’une part, les oscillations rythmiques que nous obtenons durent pour la plupart quelques dizaines de cycles, ce qui est trop court pour pouvoir varier la raideur du piège et observer une modification notable du signal. Les mouvements actifs de durée suffisamment longue ont en général un spectre trop large pour que la variation de raideur du piège donne un effet significatif. D’autre part, il existe entre la bille et les moteurs un élément élastique k_L (Fig. III.1) en série avec le ressort représentant le piège optique. Comme nous le verrons plus loin, la raideur de cet élément est souvent inférieure à la raideur du piège, si bien que la raideur effectivement sentie par les moteurs est nivelée par k_L même si la raideur du piège est modifiée.

2.2 Paramètres influençant le mouvement spontané et difficultés expérimentales rencontrées

Bien que toutes les expériences soient effectuées dans les mêmes conditions, nous avons observé une grande diversité de comportements (*cf* paragraphe précédent). Sur l’ensemble des oscillations rythmiques que nous avons obtenues, nous avons tracé la fréquence en fonction de l’amplitude, la fréquence en fonction de la raideur du piège et l’amplitude en fonction de la raideur du piège (Fig. III.6). Mais aucun de ces trois graphes ne permet de faire ressortir une interdépendance entre différents paramètres ; cela indique qu’il existe dans nos expériences une variabilité qui masque d’éventuelles corrélations.

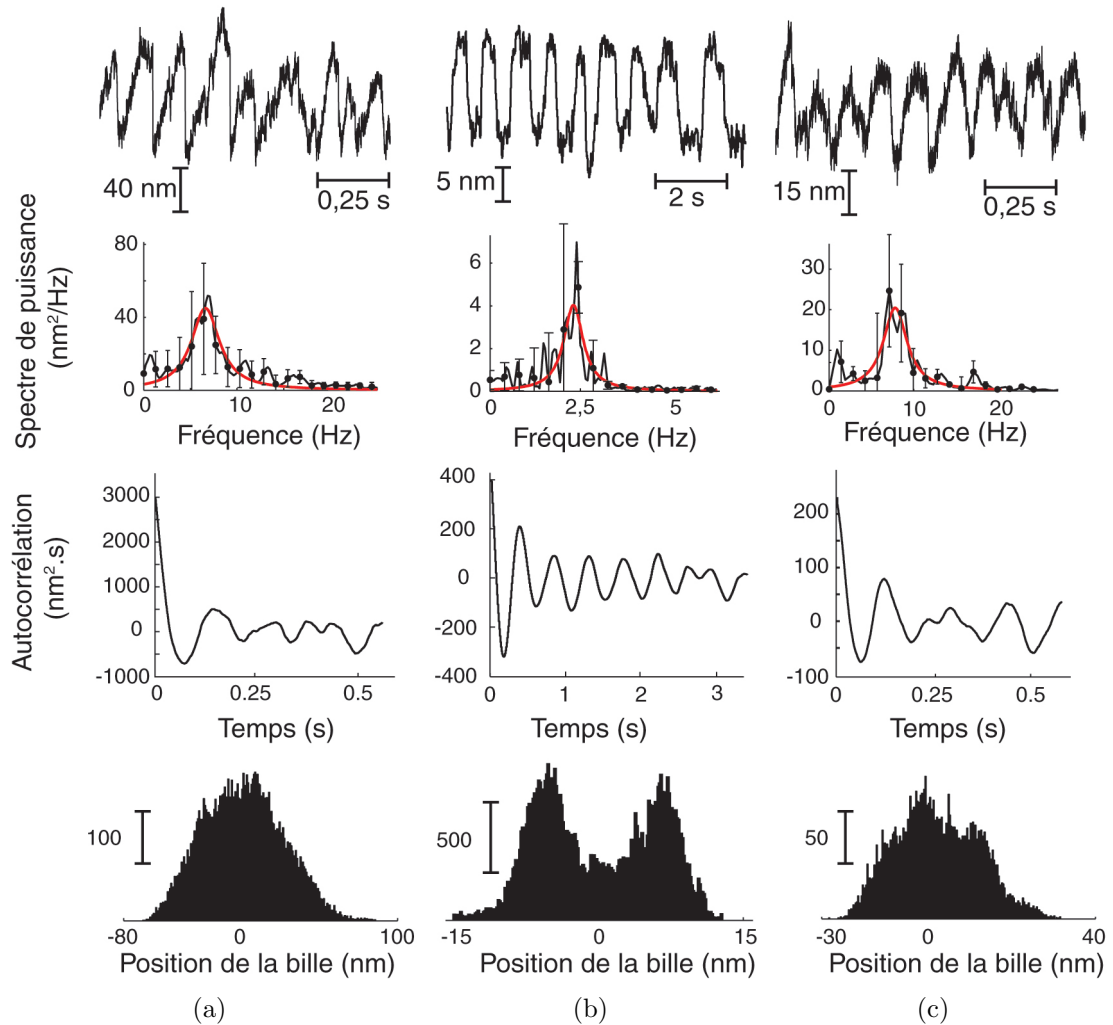


FIG. III.5: **Oscillations rythmiques générées par des HMM**

Extraits de signaux temporels, spectres de puissance lissés (sur 1 Hz pour les figures (a) et (c) et sur 0,1 Hz pour la figure (b)), fonctions d'autocorrélation et histogrammes de position.

(a) Oscillation de forme triangulaire asymétrique, semblable aux oscillations spontanées des myofibrilles. $f_0 = 6,6$ Hz, $Q = 1,8$, amplitude pic-à-pic 73 nm, raideur du piège $k_T = 0,09$ pN · nm⁻¹. Spectre calculé sur une séquence de 28 cycles d'oscillation.

(b) Oscillation de forme rectangulaire semblable aux oscillations spontanées de touffe ciliaire. L'histogramme bimodal met bien en évidence la forme rectangulaire de cette oscillation. $f_0 = 2,3$ Hz, $Q = 3,5$, amplitude pic-à-pic 9,89 nm, $k_T = 0,26$ pN · nm⁻¹. Spectre calculé sur 45 cycles d'oscillations

(c) Oscillation de forme quelconque; $f_0 = 7,8$ Hz, $Q = 2,2$, amplitude pic-à-pic 39 nm, $k_T = 0,35$ pN · nm⁻¹. Spectre calculé sur 30 cycles d'oscillations.

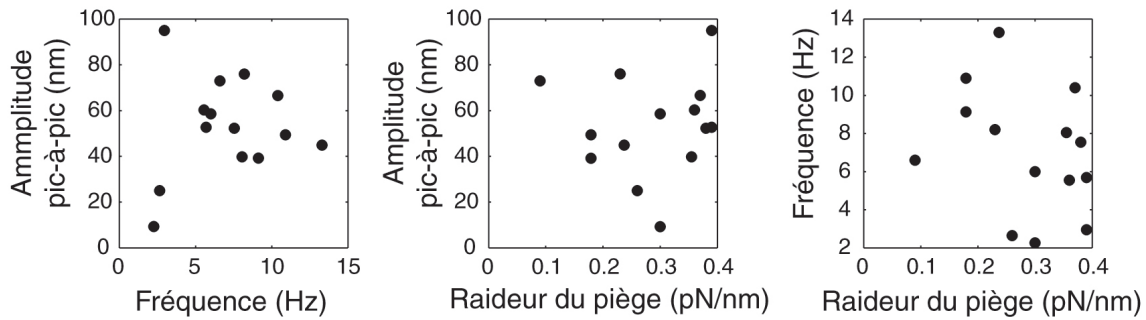


FIG. III.6: Variations conjointes des trois paramètres fréquence, amplitude des oscillations et raideur du piège

Dans tous les cas, aucune corrélation ne ressort clairement

La principale source de variabilité est probablement le nombre de moteurs correctement orientés interagissant avec le filament d'actine. Bien que la concentration de myosines dans la solution utilisée pour préparer les échantillons soit toujours la même, leur orientation par rapport au filament dépend de la manière dont elles s'adsorbent sur la lamelle, que nous ne contrôlons pas. Le nombre de moteurs impliqués dépend également de la longueur du filament. Pour chaque bille utilisée, nous pouvons estimer la longueur du filament accroché ; néanmoins nous sommes tributaires à chaque essai des billes que nous trouvons en solution et ne garder que les billes accrochées à un filament de la bonne longueur est un luxe que nous ne pouvons assumer.

D'une manière générale, l'absence de paramètre de contrôle sur les oscillations et le manque de données quantitatives souligne la fragilité de la configuration expérimentale que nous utilisons. La figure III.7 illustre les différents événements imprévus et gênants susceptibles de se produire en pleine expérience.

Il arrive que tout en interagissant avec des moteurs, le filament opère une rotation et par conséquent que la force exercée sur la bille change soudainement de direction (Fig. III.7(a)). Par ailleurs, il est probable que la cohérence des oscillations augmente avec le nombre de moteurs impliqués. Mais lorsque le nombre de moteurs augmente, la force moyenne qu'ils exercent augmente également, et très souvent des débuts de mouvements actifs très prometteurs se terminent brutalement par la rupture du filament ou du lien actine-bille (Fig. III.7(b)), ou par l'échappement de la bille hors du piège lorsque la force des moteurs est trop importante.

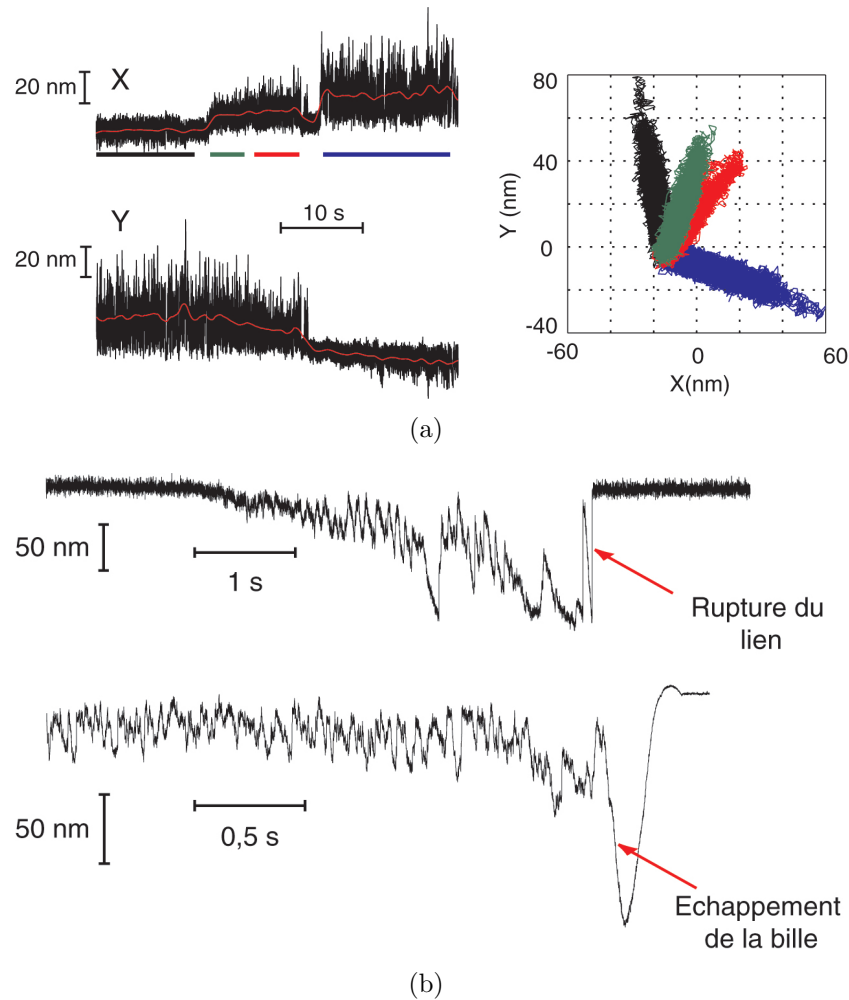


FIG. III.7: Différents phénomènes néfastes pouvant se manifester pendant les mesures

(a) Des fluctuations font tourner le filament d'actine dans le plan XY, d'un mouvement presque exclusivement selon Y vers un autre presque exclusivement selon X. A gauche : position de la bille selon X (en haut) et Y (en bas). A droite : tracé du déplacement de la bille dans le plan pour les différentes sections des signaux temporels repérés par des lignes colorées.

(b) En haut : sous l'action des moteurs, la bille commence un joli mouvement oscillant, tout en s'éloignant de plus en plus du centre du piège. Après quelques étapes de décrochement des moteurs, la force qu'ils exercent finit par avoir raison du lien bille-actine. En bas : Lorsque le lien est plus robuste, les moteurs parviennent tout de même à emporter à la fois la bille et le filament. L'échappement de la bille hors du piège se traduit, au niveau de la photodiode, par un signal fortement non linéaire.

B Relation force-vitesse d'une collection de moteurs

Parallèlement à l'étude des fluctuations spontanées d'une assemblée de moteurs opérant au voisinage de leur force d'arrêt, F_a , nous avons également caractérisé les propriétés mécaniques d'un tel système. En l'absence de force extérieure, par exemple dans un test de motilité *in vitro* traditionnel, les moteurs génèrent un mouvement du filament d'actine caractérisé par une certaine vitesse. Dans nos expériences, les moteurs sont soumis à une force qui s'oppose à leur mouvement, et la vitesse du filament sur lequel agissent les moteurs dépend de la force extérieure appliquée. La relation force-vitesse est une caractéristique essentielle de l'activité motrice du système acto-myosine.

1 Protocole

Le but de ces expériences est de mesurer la force qu'il faut appliquer à l'aide du piège optique pour imposer une vitesse constante à la bille. La pince, de raideur k_T , est rétroactionnée pour imposer la position de la bille. La consigne de la boucle de rétroaction suit une série de rampes de plus en plus rapides, centrées approximativement sur la position moyenne $x_0 = F_a/k_T$ de la bille avant que la boucle de rétroaction ne soit enclenchée, et d'amplitude $2x_m$ (Fig. III.8). Le long de chaque rampe, la vitesse de la bille est constante. La série de rampes est répétée entre 10 et 100 fois et toutes les séries sont ensuite moyennées.

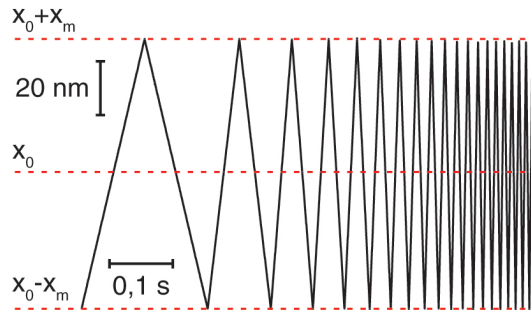


FIG. III.8: Consigne de la boucle de rétroaction du piège pour une mesure de relation force-vitesse

Cet exemple sonde les vitesses de -20 à $20 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ par incréments de $1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Une série de cette sorte est répétée un grand nombre de fois.

L'avantage de ce protocole qui alterne vitesses positives et négatives réside dans le fait que la bille se déplace sur la même zone ΔX pendant toute la mesure, et sonde donc la même famille de moteurs. ΔX est limité par le domaine de linéarité de la photodiode. En pratique, ΔX vaut au maximum 120 nm , ce qui assure que le détecteur reste linéaire quelle que soit la position moyenne de départ de la bille. En contrepartie, la durée d'une section de vitesse v vaut $\Delta t = \Delta X/v$ et à ΔX constant

elle diminue donc lorsque la vitesse étudiée augmente. Pour des vitesses suffisamment importantes, Δt peut devenir de l'ordre de ou inférieure au temps d'établissement du régime permanent, ce qui doit être pris en compte dans l'analyse et l'interprétation des données.

2 Friction sur une bille en l'absence de moteurs : importance de la distance à la lamelle et de l'état de surface de la bille

Le premier contrôle est d'effectuer la mesure de la relation force-vitesse d'une bille seule piégée à proximité de la surface de la lamelle (Fig. III.9(a)). Sur chaque rampe

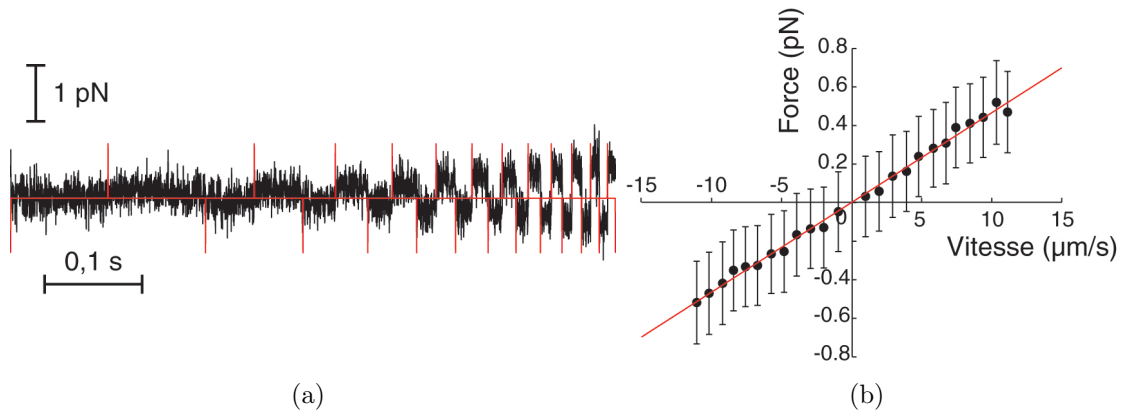


FIG. III.9: **Protocole de mesure force-vitesse appliqué à une bille seule**

(a) Trace temporelle moyenne, issue de 50 répétitions d'une série de rampes, de la force exercée par le piège. Les lignes rouges verticales marquent la transition entre deux rampes consécutives.

(b) Relation force-vitesse et ajustement linéaire. La pente de l'ajustement donne un coefficient de friction $\lambda_b = 0,046 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$

de vitesse constante, la force est constante, ce qui correspond au comportement visqueux attendu. La relation force-vitesse, obtenue en traçant la valeur moyenne de la force sur chaque rampe en fonction de la vitesse de la bille, est linéaire. (Fig. III.9(b)). Le coefficient de friction λ_b , donné par la pente de la relation force-vitesse, présente une variabilité importante ($\lambda_b = 0,014 - 0,058 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, $n=7$). La formule de Stokes, valable infiniment loin de toute paroi, stipule que le coefficient de friction d'une sphère de rayon R dans un fluide de viscosité η vaut $\lambda_{\text{Stokes}} = 6\pi\eta R$. Avec $\eta \simeq 10^{-3} \text{ Pl}$ et $R = 500 \text{ nm}$, on obtient $\lambda_{\text{Stokes}} \simeq 0,01 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

Les valeurs que nous obtenons sont supérieures à la valeur prévue par la formule de Stokes. Cela peut s'expliquer par la proximité de la surface, située à une distance inférieure à $3 \mu\text{m}$. Le positionnement des billes à différentes altitudes, non mesurées, par rapport à la surface de la lamelle conduit à des frictions différentes, ce qui explique la variabilité observée. Remarquons par ailleurs que l'état de surface de la bille et de la lamelle conditionne les valeurs mesurées lorsque la bille est très proche de la surface, qui peuvent atteindre plus de $12\lambda_{\text{Stokes}}$ (Fig. III.10). L'existence d'in-

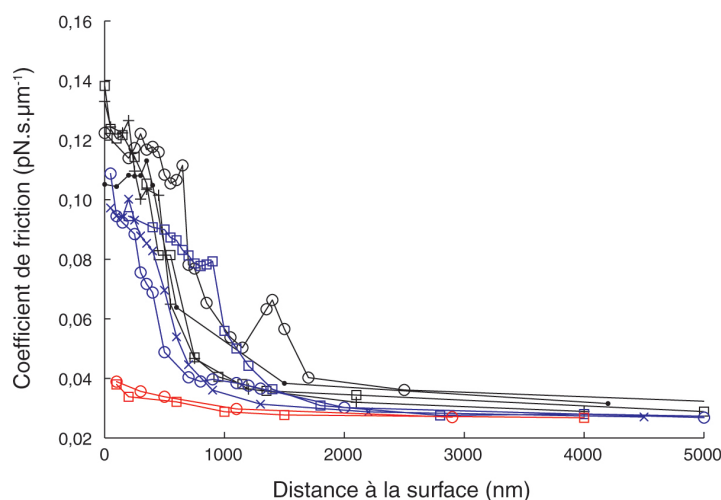


FIG. III.10: Coefficient de friction en fonction de la distance par rapport à la surface

Dans ces expériences, le coefficient de friction est évalué à partir des paramètres de l'ajustement d'une fonction lorentzienne sur le spectre de puissance des fluctuations de la bille (*cf* chapitre précédent, p. 91).

Rouge : billes, fonctionnalisées à la streptavidine, nues au-dessus d'une lamelle de verre nue. Le coefficient de friction n'augmente que légèrement lorsque la bille se rapproche de la surface, dans une gamme de valeurs compatible avec le résultat des mesures par le protocole force-vitesse.

Bleu : mêmes billes, préalablement incubées dans une solution à 0,1% de BSA, au-dessus d'une lamelle traitée à la nitrocellulose également couverte de BSA. L'augmentation de la friction est 2 à 3 fois plus importante qu'avec une bille nue ($\lambda_{\max} \simeq 0,1 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$).

Noir : billes incubées avec la BSA et liées à un ou plusieurs filaments d'actine biotinyllés, au-dessus d'une lamelle couverte de BSA. La présence de filaments d'actine sur la bille accroît légèrement l'effet d'augmentation de la friction ($\lambda_{\max} \simeq 0,12 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$)

teractions entre les protéines adsorbées sur la bille et sur la surface est probablement à l'origine de l'augmentation importante de la friction mesurée.

3 Moteurs sans ATP

Dans une solution sans ATP, les moteurs s'accrochent au filament dans l'état *rigor*, et aucune activité n'est observée. Les liens ainsi formés ont des durées de vie caractéristiques supérieures à 1 s (Nishizaka et coll., 2000). On peut vérifier expérimentalement que le filament est accroché en déplaçant le tapis de moteurs à l'aide de la platine piézoélectrique. Cela provoque la mise sous tension du filament et le développement d'une force statique, matérialisée par un décalage de la bille par rapport au centre du piège.

Les signaux obtenus en réponse au protocole force-vitesse sont très différents de ceux obtenus dans le cas d'une bille libre (Fig. III.11). La bille suit correctement la consigne en rampes, mais la force obtenue n'a pas une forme en créneaux comme dans le cas de la bille seule.

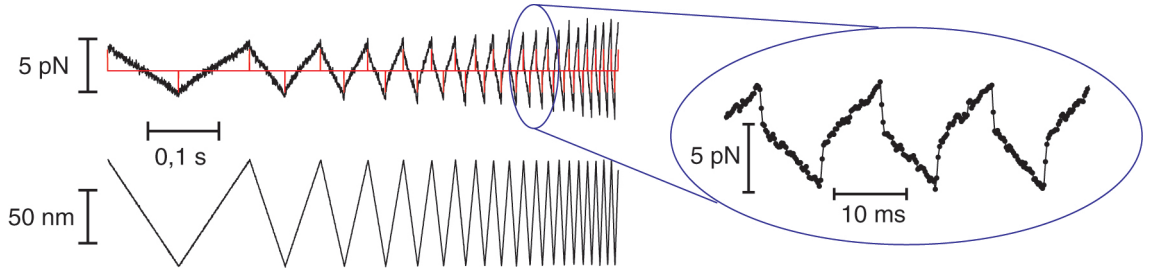


FIG. III.11: **Protocole de mesure force-vitesse sur des moteurs sans ATP**
 Traces temporelles du déplacement de la bille et de la force appliquée par le piège, obtenus après moyennage de 50 séries de rampes. A droite : agrandissement montrant la forme caractéristique du signal de force, constitué d'un saut initial suivi d'une variation linéaire.

La force se compose sur chaque rampe d'un saut initial suivi d'une variation linéaire en fonction du temps, qui constitue la différence principale avec la force obtenue pour une bille seule. Le comportement du système correspond à celui d'un système mécanique modèle illustré figure III.12. La force extérieure à appliquer à un

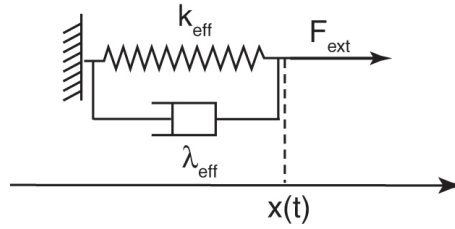


FIG. III.12: **Modélisation du système en l'absence d'ATP**
 En l'absence d'ATP, le système HMM-actine peut être représenté par l'arrangement en parallèle d'un élément visqueux, de friction λ_{eff} , et d'un élément élastique de raideur k_{eff} .

tel système pour imposer une rampe de vitesse constante $\dot{x}(t) = v$ à la bille s'écrit :

$$F_{\text{ext}}(t) = \lambda_{\text{eff}}v + k_{\text{eff}}x(t). \quad (\text{III.1})$$

Cette force est la somme de deux composantes dépendant respectivement de la vitesse et de la position de la bille.

En soustrayant la composante élastique $k_{\text{eff}}x$, on peut extraire la composante frictionnelle de la force mesurée. Pour mesurer k_{eff} , on trace pour chaque rampe la force en fonction de la position de la bille. On obtient une droite (l'exemple de la première rampe positive est montré figure III.13(a)), dont la pente varie de moins de 10% d'une rampe à l'autre (Fig. III.13(b)), ce qui indique que l'élément élastique mesuré a une raideur qui ne dépend pas de la vitesse. D'ailleurs, la relation force-déplacement du système en réponse à des marches alternées³, mesurée en régime permanent, est linéaire, de pente semblable à la valeur moyenne de k_{eff} (Fig. III.13(c)). On obtient typiquement $k_{\text{eff}} = 0,05 - 0,2 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

³Le protocole de marches alternées est détaillé plus loin, p. 136

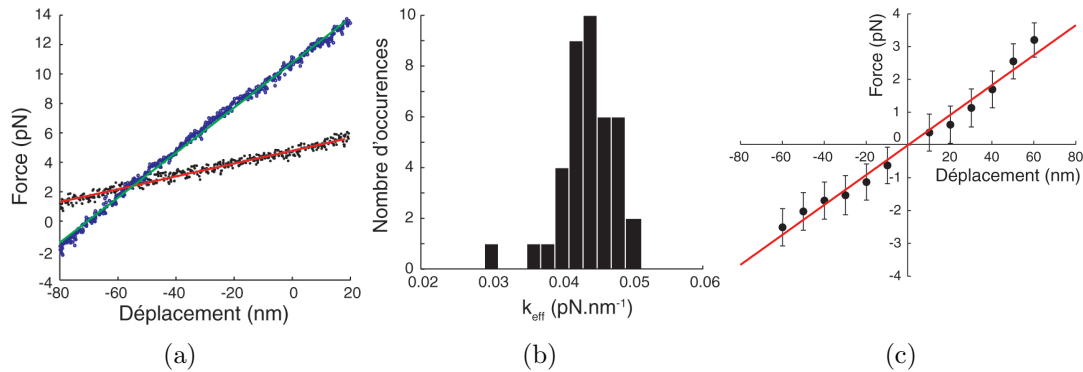


FIG. III.13: **Mesure de la composante de la force dépendant de la position**

(a) Force en fonction du déplacement sur la première rampe positive de l'enregistrement présenté fig. III.11 (points noirs). L'ajustement linéaire (droite rouge) donne une pente de $0,0436 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Lorsque la tension initiale dans le filament d'actine est augmentée (points bleus), la raideur mesurée est plus importante (pente de la droite verte : $0,152 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$).

(b) Histogramme des raideurs mesurées sur toutes les rampes. La valeur moyenne (\pm déviation standard) vaut $0,0437 \pm 0,0039 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

(c) Relation force-déplacement sur le même système moteurs-filament obtenue par un protocole de marches alternées. La raideur effective de l'ensemble du système vaut $0,045 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ selon l'ajustement linéaire.

Quel est l'élément responsable de l'élasticité représentée par k_{eff} ? Les valeurs de raideur mesurées sont toujours très inférieures à la raideur d'une HMM liée à l'actine à l'état *rigor*, mesurée en molécule unique, de l'ordre de $0,6 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ (Nishizaka et coll., 1995; Veigel et coll., 1998). De plus, au cours du protocole cet élément élastique est étiré de 50 nm , il est donc peu probable qu'il s'agisse des HMM liées à l'actine. Nous avons vu au chapitre I qu'un filament d'actine soumis à des tensions de quelques piconewtons possède une raideur, d'origine entropique, liée à l'existence de fluctuations thermiques. La valeur de celle-ci dépend de la tension appliquée et de la longueur du filament (*cf* annexe p. 194), et est comparable aux valeurs que nous mesurons. Par exemple, un filament de $5 \mu\text{m}$ de long soumis à une tension de 1 pN , a une raideur de $0,047 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Les valeurs que nous mesurons, ainsi que l'observation que l'augmentation de la tension dans le système augmente la raideur effective (*cf* ci-dessous), indiquent donc que le filament d'actine, en série avec le lien bille-actine, est vraisemblablement l'élément élastique limitant dans le système. De raideur plus faible, il masquerait la raideur beaucoup plus forte des HMM liées au filament, qui servent alors uniquement de points d'ancrage.

Après soustraction au signal brut de force de la contribution de l'élément élastique, on obtient une force en créneaux caractéristique d'un comportement visqueux. La relation force-vitesse, obtenue en traçant la force moyenne sur chaque rampe en fonction de la vitesse de la rampe, est linéaire (Fig. III.14). Dans le cas illustré ici, $\lambda_{\text{eff}} = 0,145 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Remarquons que ce coefficient est du même ordre que ceux mesurés sur des billes décorées d'un filament d'actine, au voisinage d'une lamelle recouverte de BSA, que nous mentionnions au paragraphe précédent.

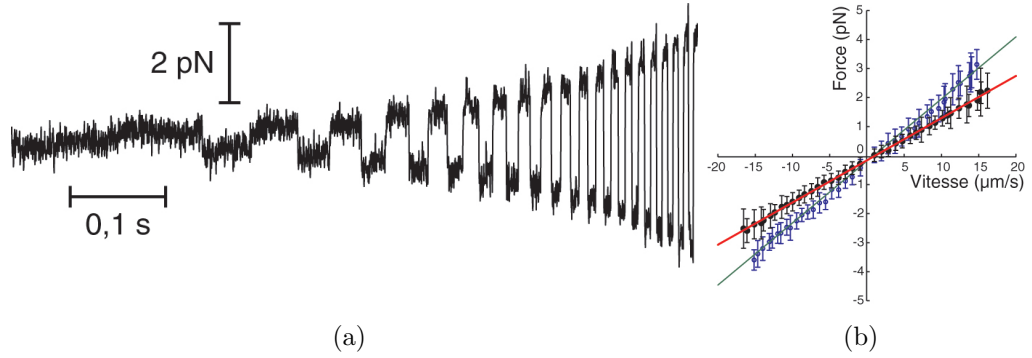


FIG. III.14: **Relation force-vitesse mesurée en l'absence d'ATP**

(a) Trace temporelle de la force après soustraction de la composante dépendant de la position de la bille. On obtient un signal en créneaux.

(b) La relation force-vitesse obtenue (ronds noirs pleins) est linéaire. Le coefficient de friction, donné par la pente de l'ajustement linéaire (en rouge), vaut $\lambda_{\text{eff}} = 0,145 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Lorsque la tension initiale dans le filament d'actine est augmentée, la relation force-vitesse (cercles bleus) donne un coefficient de friction plus important ($\lambda_{\text{eff}} = 0,21 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$).

Nous avons observé qu'une augmentation de la tension initiale dans le filament, obtenue en déplaçant la platine piézoélectrique dont la lamelle et les moteurs sont solidaires, conduit à une augmentation de la raideur de l'élément élastique k_{eff} et du coefficient de friction λ_{eff} (Fig. III.13(a) et III.14(b)). Lors d'une expérience où le filament s'est brisé en cours d'enregistrement, nous avons également observé que la friction mesurée est plus importante avant qu'après la cassure du filament (Fig. III.15).

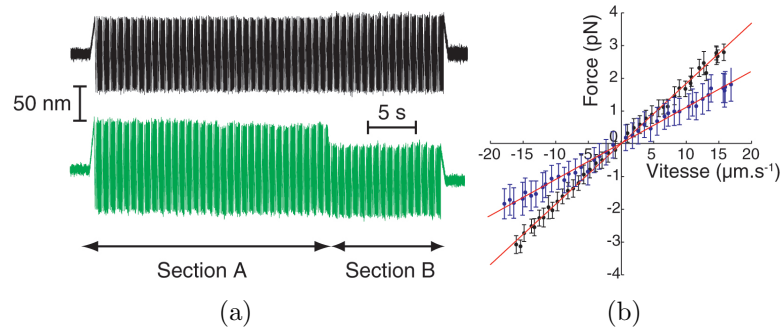


FIG. III.15: **Brisure du filament pendant le protocole force-vitesse**

(a) Traces temporelles du déplacement de la bille (noir) et du piège (vert). La bille est accrochée aux moteurs pendant les 35 premières répétitions du protocole (section A; $k_{\text{eff}} = 0,07 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$). Après la rupture du filament, la bille est libre (section B). La diminution d'amplitude du mouvement du piège indique la perte de la force élastique ($k_{\text{eff}} = 0$). La variation de la position du piège avant et après la série de rampes permet d'estimer la tension dans le filament avant la rupture à environ $5,5 \text{ pN}$ ($k_T = 0,22 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$).

(b) La friction mesurée sur la section A (points noirs; $\lambda = 0,184 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) est supérieure d'un facteur 1,5 environ à la friction mesurée sur la section B (points bleus; $\lambda = 0,111 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$).

Le tracé de la raideur en fonction du coefficient de friction sur l'ensemble des données à notre disposition ($n=24$), confirme que la friction mesurée croît avec la raideur du système (Fig. III.16(a)). Il est probable que ce phénomène soit un effet

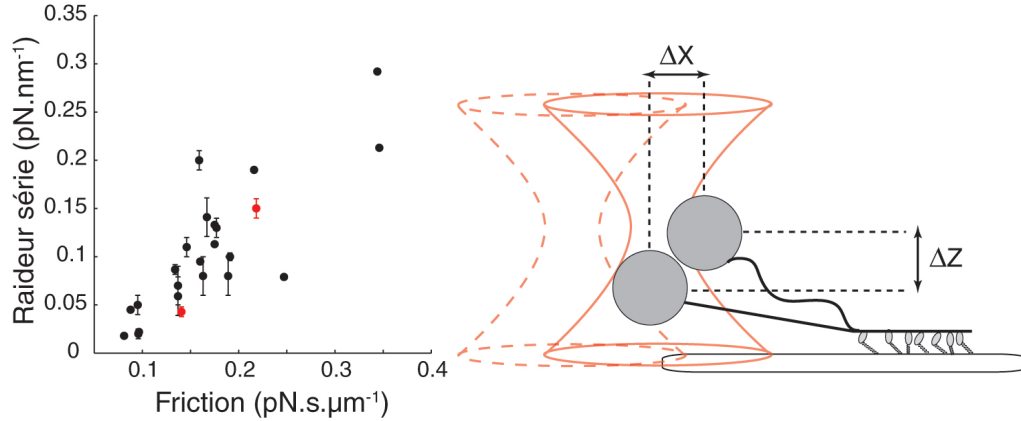


FIG. III.16: **Variation conjointe de k_{eff} et λ_{eff}**

(a) Raideur effective du système en fonction de la friction mesurée. Les deux points en rouge repèrent les deux expériences détaillées figures III.13 et III.14.

(b) Schéma d'une bille liée à un filament au contact de moteurs dans une solution sans ATP. L'augmentation de la tension dans le filament (obtenue en déplaçant le piège, comme l'indique ici le tracé en tirets rouges, ou en déplaçant la lamelle à l'aide d'une platine piézoélectrique, comme nous le faisons expérimentalement), conduit à une augmentation de la distance latérale ΔX entre la bille et le centre du piège, ainsi qu'à une diminution ΔZ de la distance entre la bille et la surface.

indirect de la méthode utilisée pour augmenter k_{eff} . Sous l'effet de l'augmentation de la tension dans le filament, la bille est rapprochée de la surface de la lamelle (Fig. III.16(b)), dans une zone où la friction hydrodynamique qui s'exerce sur elle est plus importante. La raideur mesurée peut aussi être plus importante si la portion de filament d'actine qui n'interagit pas avec les moteurs est courte, ce qui se traduit également par une diminution de la distance entre la bille et la surface. Dans cette interprétation, les moteurs se comportent comme un lien permanent et la friction mesurée est imposée par la friction hydrodynamique sur la bille et la portion du filament d'actine qui n'interagit pas avec les moteurs.

4 Moteurs actifs

En présence d'ATP, contrairement au cas précédent, les moteurs effectuent des cycles rapides d'accrochage-décrochage du filament d'actine. Nous avons appliqué le protocole de rampes alternées décrit précédemment au système actine-myosines consommant de l'ATP. Six expériences ont donné des résultats similaires à ceux illustrés ci-dessous.

4.1 Application du protocole de mesure force-vitesse

Contrairement aux expériences sans ATP, la force développée par le système en réponse à une rampe de vitesse positive (dans le sens du mouvement spontané des moteurs en l'absence de force) est qualitativement différente de celle qui est développée en réponse à une rampe de direction opposée (Fig. III.17). Le système acto-myosine est donc asymétrique.

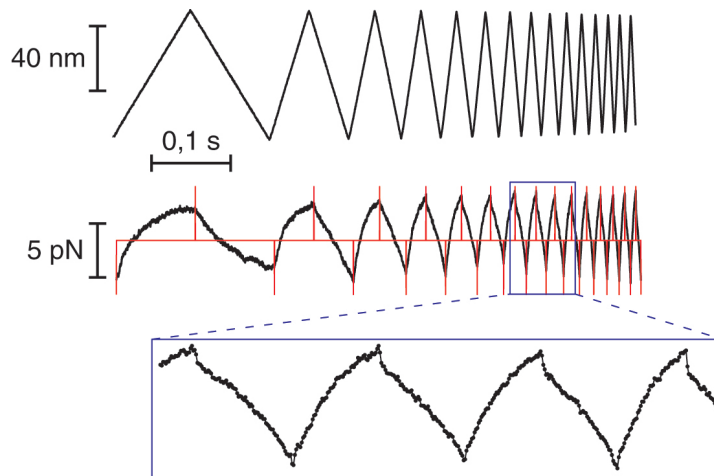


FIG. III.17: **Signaux bruts de déplacement et de force obtenus sur des moteurs actifs**

En haut : déplacement de la bille moyenné sur 100 répétitions d'une série de rampes explorant une gamme de vitesse de -10 à $10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, par pas de $0,6 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce signal montre que la bille suit correctement la consigne de la boucle de rétroaction. Au milieu : force moyenne correspondante exercée par le piège. L'agrandissement du signal de force (en bas) met en évidence l'asymétrie de la forme des courbes entre les rampes positives et négatives.

4.2 Obtention de la contribution frictionnelle

Dans la direction négative, la force moyenne a une allure similaire aux signaux obtenus lors des expériences sans ATP : comme le montre l'agrandissement, elle présente un saut initial suivi d'une décroissance approximativement linéaire. Par analogie avec le cas sans ATP, on peut écrire :

$$F_{\text{ext}} = F(v) + k_{\text{eff}}x, \quad (\text{III.2})$$

où on a remplacé la contribution visqueuse $\lambda_{\text{eff}}v$ par une force dépendante de la vitesse, incluant la force active des moteurs. k_{eff} est estimée en traçant la force en fonction du déplacement sur chaque rampe. On trouve une valeur indépendante de la vitesse à 10% près (Fig. III.18(a)). En utilisant cette valeur de raideur, on peut soustraire la contribution dépendant de la position à toutes les rampes. On vérifie que le signal de force corrigé est approximativement constant sur toutes les rampes (Fig. III.18(b)). La raideur k_{eff} , de l'ordre de $0,1 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, est du même ordre de grandeur

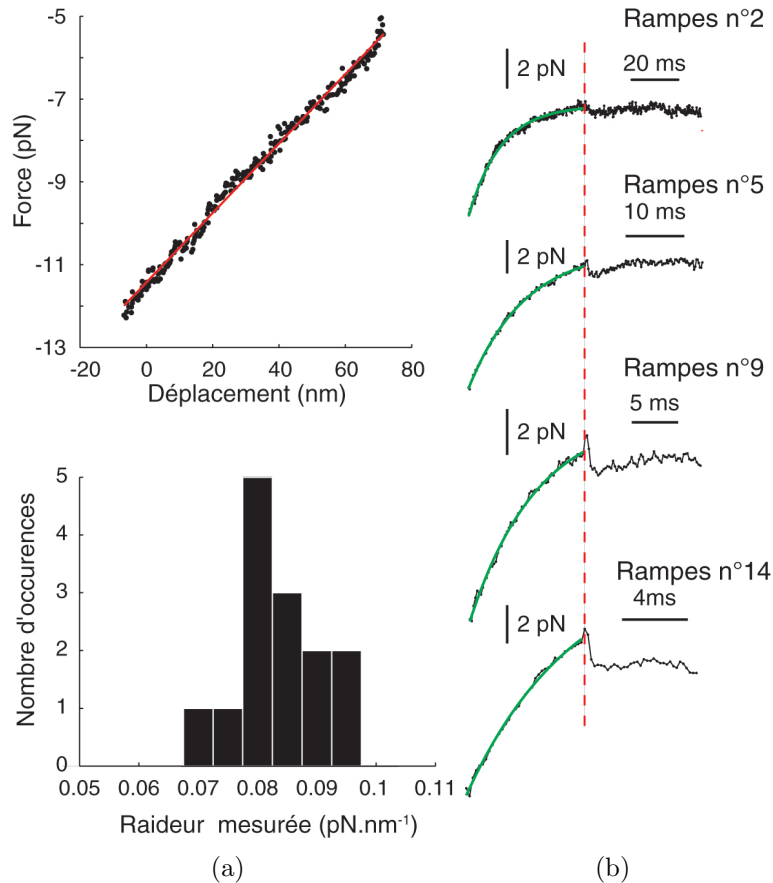


FIG. III.18: Détails de la mesure de la force en régime stationnaire

(a) En haut : force en fonction du déplacement sur la deuxième rampe négative. La courbe est linéaire, de raideur $k_{\text{eff}} = 0,083 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. En bas : histogramme des raideurs mesurées sur toutes les rampes négatives. La valeur moyenne (\pm déviation standard), vaut $0,084 \pm 0,007 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

(b) Détail des rampes positives et négatives après retrait de la composante dépendant de la position de la bille. La ligne rouge marque la séparation entre la rampe de vitesse positive et la rampe de vitesse négative. Sur la rampe négative, la force est constante. A la force sur les rampes positives peut être ajustée une fonction exponentielle, tracée en vert.

que lors des expériences sans ATP. On peut comme précédemment l'attribuer au filament d'actine entre la bille et les moteurs⁴. Comme dans le cas sans ATP, le

⁴Un examen attentif du comportement de la force sur ces rampes (Fig. III.17) montre qu'après le saut initial, un léger épaulement précède le développement de la force élastique, qui n'est pas rigou-

développement d'une force élastique indique qu'il existe des points d'ancrage du filament d'actine⁵. La partie dépendante de la vitesse, $F(v)$, est calculée en prenant la valeur moyenne sur chaque rampe du signal corrigé.

Dans le cas des rampes positives, dans le sens du mouvement spontané généré par les moteurs, la force ne présente pas de saut au début des rampes. La force ne croît pas linéairement, mais semble saturer vers une valeur stationnaire, en particulier sur les premières rampes. Bien que la durée des rampes soit trop brève pour permettre l'établissement du régime stationnaire, on peut approximer la variation temporelle par une croissance exponentielle, ce qui revient à modéliser la réponse du système comme illustré figure III.19. Cette modélisation est approximative, dans la mesure

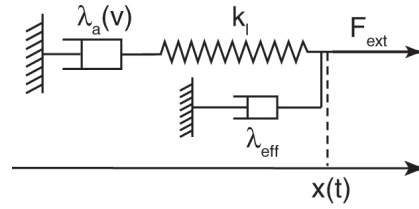


FIG. III.19: Modélisations mécaniques du système pour les rampes positives

Les moteurs sont supposés caractérisés par une friction effective λ_a . k_l représente un élément élastique en série entre la bille et les moteurs, déterminant la durée du régime transitoire $\tau = \lambda_a/k_l$.

où les moteurs actifs ne sont certainement pas un simple système linéaire, mais elle constitue une première approche utile pour analyser les résultats expérimentaux. Avec ces notations, la force extérieure pour imposer à la bille une vitesse constante vaut

$$F_{\text{ext}} = F(v)(1 - e^{-t/\tau}), \tag{III.3}$$

avec $F(v) = (\lambda_{\text{eff}} + \lambda_a)v$, $\tau = \lambda_a/k_l$, et où on a supposé que $F_{\text{ext}} = 0$ à $t = 0$.

Sur toutes les rampes positives, on peut ajuster de manière satisfaisante une fonction exponentielle $f(t) = f_1(1 - e^{-t/\tau}) + f_2$ (Fig. III.18(b)). La force en régime stationnaire $F(v)$ est obtenue en calculant pour chaque rampe $f_1 + f_2$. Les temps caractéristiques des exponentielles ajustées ne sont pas constants (Fig. III.20), ce qui indique que la relaxation des moteurs est plus complexe que celle d'un système purement linéaire (*cf* discussion p. 149).

reusement linéaire mais légèrement concave. Ces deux observations trahissent vraisemblablement la non-linéarité de l'élément élastique.

⁵Nous discuterons plus en détail l'origine possible de cette composante élastique p. 149

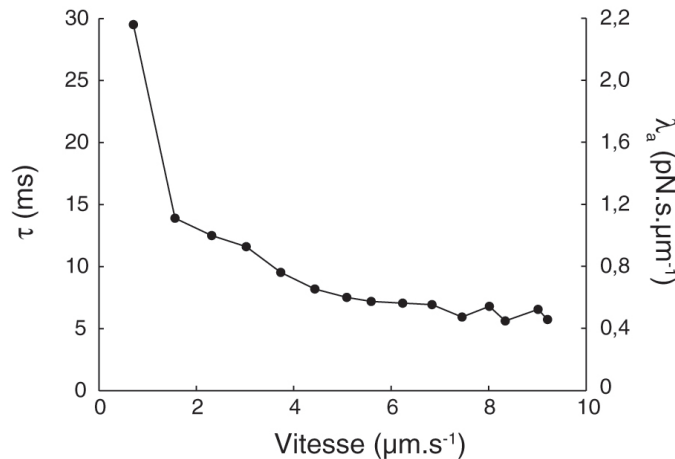


FIG. III.20: Temps de relaxation des ajustements exponentiels sur les rampes positives

Le temps caractéristique du régime transitoire $\tau = \lambda_a/k_l$ décroît lorsque la vitesse augmente. L'axe des ordonnées à droite représente les variations de λ_a , en supposant que k_l est constant et égal à la valeur mesurée sur les rampes négatives ($0,08 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$).

4.3 Tracé de la relation force-vitesse

La relation force-vitesse obtenue est fortement non linéaire (Fig. III.21). Dans le domaine des vitesses positives, la valeur asymptotique de la friction vaut, sur l'exemple illustré ici, $\lambda_\infty = 0,67 \text{ pN}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. Les valeurs de friction de nature hydrodynamique λ_{eff} que nous avons mesurées en l'absence d'ATP sont de l'ordre de $0,1$ à $0,2 \text{ pN}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ (Fig. III.16(a)), et donc bien inférieures à λ_∞ . En revanche, $\lambda_\infty - \lambda_{\text{eff}} \simeq 0,5 \text{ pN}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, en bon accord avec la valeur estimée de λ_a pour les rampes de grande vitesse (Fig. III.20). La friction asymptotique est donc principalement dictée par la friction d'origine moléculaire due à l'interaction des moteurs avec le filament, qui surpasse la friction hydrodynamique sur la bille et le filament. A cet égard, il est cohérent que la vitesse à force nulle, environ 8 à $9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, soit en bon accord avec la vitesse moyenne de filaments, mesurée sur deux expériences de test de motilité *in vitro* dans des conditions similaires, mais sans billes (*cf* fig. III.2). Cet accord quantitatif valide *a posteriori* la modélisation approximative utilisée pour obtenir la force en régime stationnaire sur les rampes positives.

Lorsque la force appliquée augmente en valeur absolue, la vitesse des moteurs diminue, jusqu'à devenir nulle pour une valeur proche de la force d'arrêt des moteurs, mesurée de manière indépendante à partir d'un enregistrement du mouvement spontané des moteurs.

Dans le domaine des vitesses négatives, la courbe devient non monotone. Le point de vitesse nulle se trouve au bord d'une région où la pente est négative. Physiquement, un domaine de pente négative dans la relation force-vitesse correspond à un régime stationnaire instable du système, et définit donc un domaine de vitesses inaccessible dans lequel le système ne peut spontanément se placer en régime permanent.

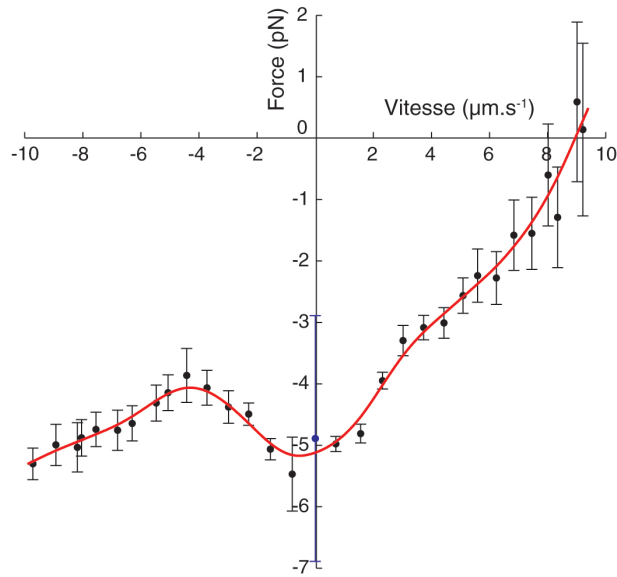


FIG. III.21: **Relation force-vitesse d'une collection de moteurs actifs**

Les points obtenus comme indiqué dans le texte sont en noir. La force d'arrêt des moteurs, mesurée indépendamment à partir de l'enregistrement du mouvement spontané généré par les moteurs, est en bleu. La courbe rouge est une fonction arbitraire reproduisant l'allure de la relation force-vitesse. La relation force-vitesse obtenue est non linéaire, et même non monotone : entre -6 et $-1 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, la pente de la courbe est négative.

4.4 Mouvement spontané

La présence d'un domaine de pente négative dans le diagramme force-vitesse peut conduire, si le système est couplé à un ressort, à un mouvement oscillatoire selon le mécanisme que nous avons exposé au chapitre I (p. 60). Le mouvement spontané du système dont la courbe force-vitesse est illustrée figure III.21 présente de grandes fluctuations oscillantes bruitées, avec par intermittence des séquences de mouvement quasi-rythmique, mais de courte durée, dont une occurrence est montrée figure III.22. Bien que les cycles d'oscillation soient très bruités, ils sont le plus souvent asymétriques, plus lents dans la direction positive que dans la direction négative.

Dans cette interprétation, cette asymétrie du mouvement oscillant est liée au fait que la relation force-vitesse est asymétrique (Jülicher et Prost, 1997) : elle n'est pas centrée sur l'origine, et la zone de pente négative n'est pas symétrique par rapport à l'axe des forces. En conséquence, les vitesses négatives, que le système atteint lorsqu'il se situe à gauche de la zone de pente négative, sont plus importantes que les vitesses positives lorsqu'il est de l'autre côté. L'asymétrie de la relation force-vitesse provient probablement du fait que le système acto-myosine est intrinsèquement asymétrique, puisqu'en l'absence de force, les moteurs génèrent un mouvement uniquement dans la direction positive.

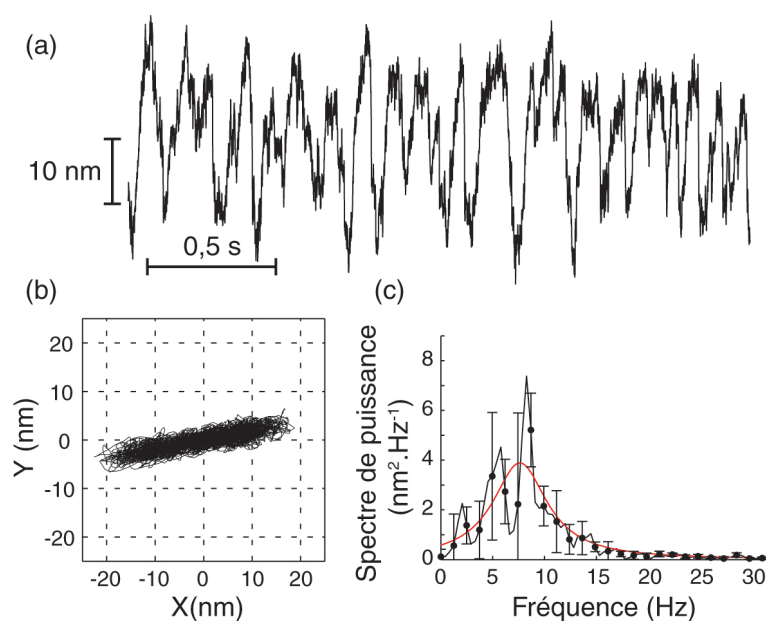


FIG. III.22: **Mouvement spontané du système soumis à la mesure force-vitesse**

(a) Extrait de 2,5 s du signal temporel, moyenné sur 1 ms.

(b) Mouvement de la bille tracé dans le plan XY. Le mouvement est quasiment aligné avec l'axe X.

(c) Spectre de puissance de l'extrait montré en (a). L'ajustement lorentzien donne une fréquence centrale $f_0 = 7,6$ Hz et un facteur de qualité $Q = 1,2$

4.5 Relation force-vitesse et décaage d'ATP

En déclenchant l'activité d'un ensemble de moteurs par la photolyse d'ATP cagé, il est possible, sur le même système actine-myosines, de mesurer la relation force-vitesse lorsque les moteurs sont passifs puis lorsqu'ils consomment de l'ATP. L'analyse des données brutes avant et après la photolyse du DMNPE-ATP, suit les mêmes étapes que pour les expériences sans et avec ATP, respectivement. Les résultats d'une telle expérience sont illustrés Fig. III.23.

Ces résultats confirment que la non-linéarité observée dans la relation force-vitesse en présence d'ATP est bien due à l'activité des moteurs, puisque les mêmes moteurs présentent une relation force-vitesse linéaire lorsque l'ATP n'est pas disponible.

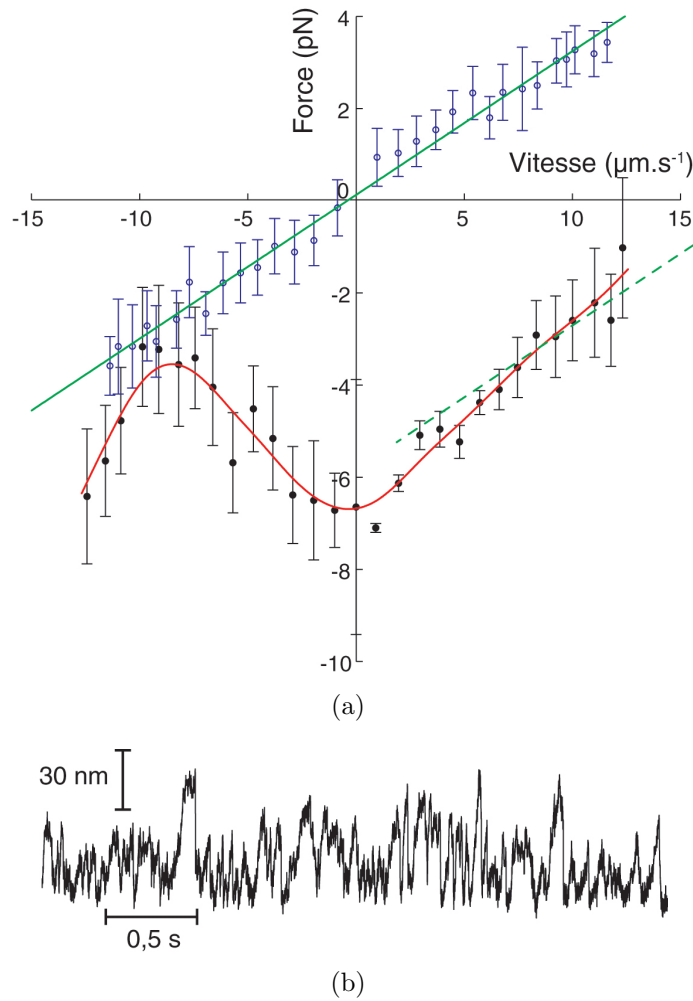


FIG. III.23: Mesure de relation force-vitesse en présence d'ATP cagé

(a) Lorsque l'ATP est cagé, la force moyenne brute contient une contribution dépendant de la vitesse et une contribution dépendant de la position de la bille. La raideur effective est évaluée à $0,21 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Après soustraction de la composant élastique, le signal de force résultant a une forme en créneaux, donnant une relation force-vitesse linéaire (cercles bleus), avec un coefficient de friction $\lambda = 0,31 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Après libération d'ATP, la force moyenne brute obtenue en appliquant le protocole force-vitesse est asymétrique ; sur les rampes négatives, une force élastique se développe, caractérisée par une raideur indépendante de la vitesse de la rampe ($k_{\text{eff}} \simeq 0,15 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$). La relation force-vitesse est non linéaire et présente dans le domaine des vitesses négatives une large zone de pente négative, au bord de laquelle se trouve le point de vitesse nulle. La pente asymptotique de la relation force-vitesse est légèrement supérieure à la pente de la relation force-vitesse obtenue lorsque les moteurs sont passifs, indiquant une contribution de la friction moléculaire des moteurs actifs. Il est toutefois hasardeux de comparer les frictions avant et après la photolyse, puisque le déclenchement de l'activité des moteurs, et le relâchement de la tension dans le filament qui en découle, peuvent éloigner la bille de la surface, ce qui entraînerait une diminution importante de la friction hydrodynamique.

(b) Extrait du mouvement généré par les moteurs après le déclenchement du laser UV libérant l'ATP. L'activité des moteurs donne lieu à un signal oscillant de manière irrégulière.

C Réponse de moteurs à des marches alternées

Une autre manière de caractériser les propriétés mécaniques des moteurs interagissant avec le filament d'actine consiste à mesurer le mouvement du système en réponse à un déplacement abrupt du piège optique, pour étudier la relaxation à la force ainsi appliquée. Il est à noter que des expériences similaires ont été réalisées avec des fibres musculaires, et que de telles expériences pourraient être pertinentes pour décrire le phénomène d'adaptation dans les cellules ciliées de l'oreille interne. Remarquons que dans la plupart de nos expériences, nous n'avons travaillé ni à déplacement ni à force imposés. Un exemple de réponse à déplacement imposé sera néanmoins décrit à la fin de cette section.

Comme nous l'avons déjà observé dans les mesures de réponse à des rampes alternées présentées dans la section précédente, ces mesures mettent en exergue la différence de comportement du système acto-myosine selon qu'il est stimulé dans la direction positive (celle du mouvement naturel des moteurs) ou négative.

1 Réponse de moteurs passifs

1.1 Description qualitative

Dans une solution sans ATP, une bille liée à un filament est piégée et amenée à proximité de la surface couverte de moteurs. Pour vérifier l'accrochage de moteurs au filament, celui-ci est mis sous tension en déplaçant la surface par rapport au piège. La force statique ainsi développée (typiquement entre 5 et 20 pN) est prise comme origine des forces dans la suite de la mesure. On applique une série de marches alternées au piège. Un exemple de réponse est illustré figure III.24. Pour chaque marche, la bille atteint un état stable, correspondant à un déplacement systématiquement inférieur en valeur absolue à la position du piège (Fig. III.24(b)). En conséquence, les signaux de force atteignent un plateau non nul, ce qui confirme la présence dans le système d'un élément élastique permanent lorsque les moteurs ne sont pas en mesure d'hydrolyser de l'ATP. Le régime permanent s'établit après un régime transitoire qui dure moins de 500 μ s (Fig. III.26(b)). Afin d'étudier avec précision ce régime transitoire, dans toutes les expériences présentées dans cette section les signaux sont échantillonnés à une cadence de 20 kHz.

1.2 Modélisation

Pour analyser les résultats de ces expériences, nous modélisons le système comme pour les mesures force-vitesse sans ATP. Cependant, comme la pince n'est pas rétroactionnée, il faut faire apparaître le ressort symbolisant l'action du piège sur la bille, de raideur k_T (Fig. III.25).

L'équation du mouvement de la bille s'écrit

$$\lambda_{\text{eff}}\dot{X} + (k_{\text{eff}} + k_T)X = k_T\Delta. \quad (\text{III.4})$$

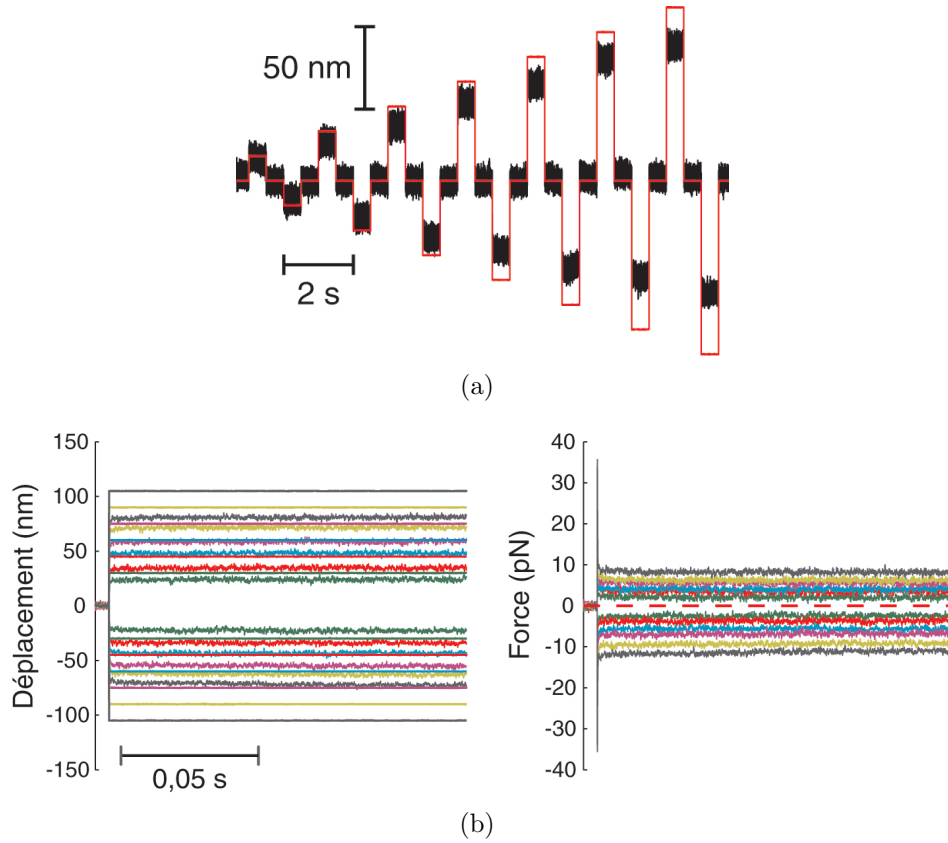


FIG. III.24: Mesure de la réponse d'une assemblée de moteurs passifs à des marches alternées

(a) Extrait des signaux bruts enregistrés : déplacement de la bille (noir) et position du piège (rouge), centrée sur celle de la bille. Raideur du piège : $k_T = 0,34 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

(b) Signaux issus du moyennage de 5 séries de marches. À gauche : superposition des déplacements moyens de la bille (signaux bruités) et du piège (créneaux parfaits) pour chaque marche. Les signaux de même couleur correspondent à une même marche. À droite : force exercée par le piège. L'écart asymptotique entre les déplacements du piège et de la bille, ainsi que les valeurs asymptotiques non nulles des forces, indiquent une relaxation incomplète.

En régime permanent, la bille atteint une position

$$X_0 = \frac{k_T}{k_{\text{eff}} + k_T} \Delta \quad (\text{III.5})$$

et elle subit une force constante

$$F_0 = \frac{k_{\text{eff}} k_T}{k_{\text{eff}} + k_T} \Delta = k_{\text{eff}} X_0 . \quad (\text{III.6})$$

L'écart entre la position du piège et celle de la bille est donc dû à l'existence de l'élément élastique permanent k_{eff} . Le tracé de la relation force déplacement en régime permanent, F_0 en fonction de X_0 , permet d'accéder expérimentalement à

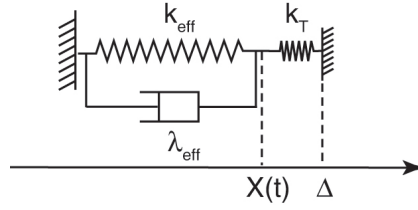


FIG. III.25: **Modélisation mécanique du système en expérience de marches alternées sans ATP**

Pour l'ensemble bille-actine-moteurs, le schéma est identique à celui présenté figure III.12. pour les expériences force-vitesse sans ATP, mais ici, puisque la pince fonctionne en boucle ouverte, on agit sur la position du piège Δ et non pas sur la position de la bille X .

k_{eff} . Pendant le régime transitoire, le déplacement et la force obéissent aux lois suivantes :

$$X(t) = X_0(1 - e^{-t/\tau}) \quad (\text{III.7})$$

$$F(t) = F_0 + \frac{k_T^2 \Delta}{k_{\text{eff}} + k_T} e^{-t/\tau} \quad (\text{III.8})$$

où $\tau = \lambda_{\text{eff}} / (k_{\text{eff}} + k_T)$.

Pour évaluer l'ampleur de la relaxation de force, on définit la "fraction de relaxation" φ :

$$\varphi = 1 - \frac{F_0}{F(t=0)}. \quad (\text{III.9})$$

Avec les expressions précédentes, on obtient

$$\varphi = \frac{1}{1 + \frac{k_{\text{eff}}}{k_T}}. \quad (\text{III.10})$$

Pour ce système passif, la fraction de relaxation est indépendante de l'amplitude de la marche Δ et entièrement déterminée par l'importance relative des raideurs du système étudié et du piège.

1.3 Analyse quantitative des résultats

La répétition de ce protocole sur des systèmes différents ($n=6$) donne des résultats qualitativement similaires. Dans tous les cas, on observe en régime permanent le développement d'une force élastique. Mais la relation force-déplacement, en général, est non linéaire (Fig. III.26(a)). Dans le domaine des déplacements positifs⁶, la pente moyenne de la courbe k_{eff}^+ est inférieure à la pente moyenne pour les déplacements négatifs k_{eff}^- . Dans les deux cas, la raideur résultante est beaucoup plus faible que la

⁶Dans les expériences sans ATP, on ne peut pas connaître la direction du mouvement généré par les moteurs en l'absence de force, prise conventionnellement comme direction positive lorsque les moteurs sont actifs. Dans ce paragraphe, la direction positive réfère systématiquement à la direction où la raideur effective est la plus faible.

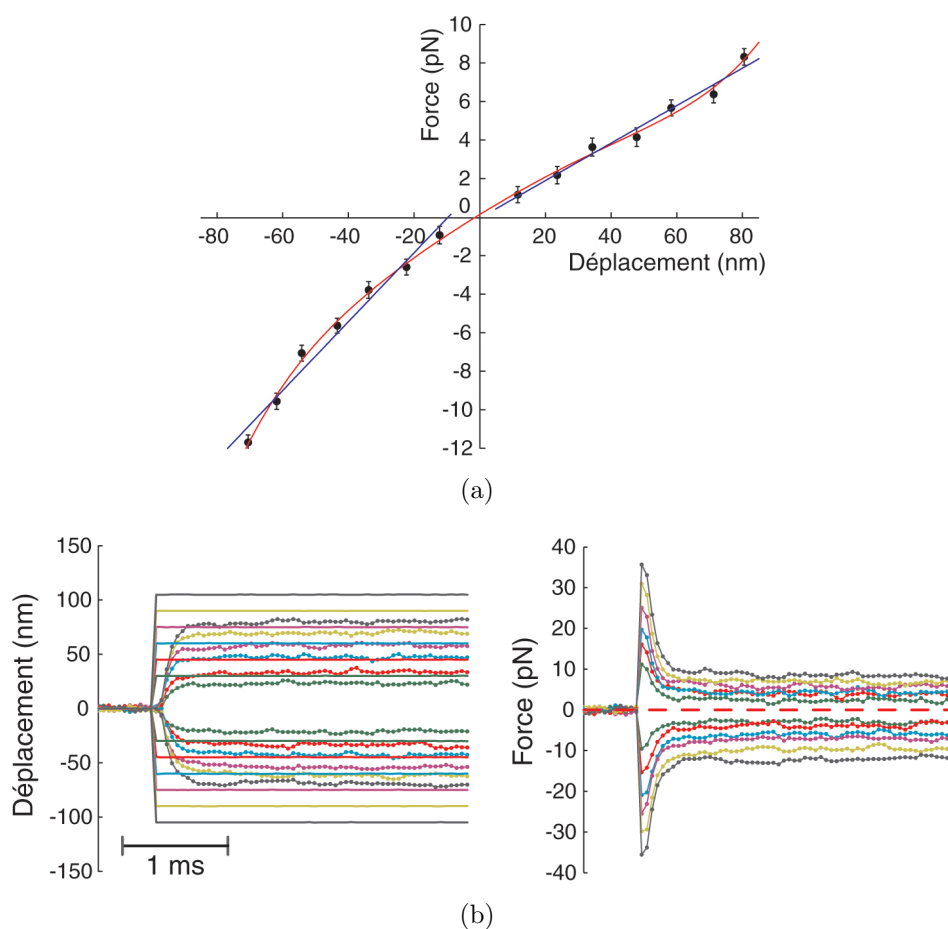


FIG. III.26: **Analyse du régime permanent et du régime transitoire de la relaxation des moteurs passifs**

(a) Courbe force-déplacement mesuré en régime permanent. Le déplacement et la force sont estimés pour chaque marche en effectuant une moyenne entre 3 et 20 ms après le début de la marche. La courbe obtenue est non linéaire, ce qui est particulièrement visible sur les plus grandes marches négatives. Les pentes des meilleurs ajustements linéaires valent $0,17 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ pour les marches négatives, et $0,09 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ pour les marches positives. Le tracé rouge est une fonction arbitraire reproduisant l'allure de la relation force-déplacement.

(b) Agrandissements des signaux temporels du déplacement de la bille et de la force exercée par le piège sur la durée du régime transitoire. La force en régime transitoire suit un comportement exponentiel. Le temps caractéristique moyen est pour les marches positives $\langle \tau_{\text{pos}} \rangle = 130 \pm 9 \mu\text{s}$ et pour les marches négatives $\langle \tau_{\text{neg}} \rangle = 146 \pm 13 \mu\text{s}$. L'asymétrie de k_{eff} a pour conséquence une différence de la fraction de relaxation entre les marches positives ($\langle \varphi_{\text{pos}} \rangle = 0,81 \pm 0,01$) et négatives ($\langle \varphi_{\text{neg}} \rangle = 0,74 \pm 0,02$), donnant $\alpha = 0,09$.

raideur d'un accrochage actine-myosine. Les moteurs ne contribuent donc probablement pas à cette élasticité et l'effet le plus important provient de la combinaison en série du filament d'actine et du lien actine-bille : $k_{\text{eff}} \simeq k_L$. La non linéarité observée sur la relation force-déplacement serait liée dans ces conditions à la non-linéarité de

k_L en fonction de la tension qui lui est imposée (*cf* chapitre II, p. 100) : lorsqu'on déplace le piège, et la bille, dans la direction négative, la tension dans le lien et le filament augmente, et conduit à une augmentation de la raideur mesurée. La relation force-déplacement peut-être plus ou moins asymétrique selon les systèmes étudiés (*cf* fig. III.13(c) pour un cas symétrique), en fonction probablement de la tension initiale imposée au système. Les pentes k_{eff}^+ et k_{eff}^- diffèrent au plus d'un facteur 3 dans les cas les plus asymétriques.

Sur toutes les marches, on peut ajuster de manière satisfaisante au signal temporel de la force une fonction exponentielle $F(t) = A_1 e^{-t/\tau} + A_2$. Dans tous les cas, le temps caractéristique moyen sur les marches positives est légèrement inférieur à celui sur les marches négatives. Sur l'exemple illustré figure III.26(b), $\langle \tau_{\text{pos}} \rangle = 130 \pm 9 \mu\text{s}$ et $\langle \tau_{\text{neg}} \rangle = 146 \pm 9 \mu\text{s}$. Comme $\tau = \lambda_{\text{eff}} / (k_{\text{eff}} + k_T)$, cette différence traduit une variation similaire des coefficients de friction sur les marches positives ($\lambda_{\text{eff}}^+ = 0,056 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) et négatives ($\lambda_{\text{eff}}^- = 0,074 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). Cela peut s'expliquer de la manière suivante : à l'occasion des marches négatives, la tension dans le filament augmente, ce qui provoque une augmentation de k_{eff} et rapproche la bille de la surface (*cf* fig. III.16(b)), dans une zone où la friction hydrodynamique est plus importante. Remarquons cependant que les différences induites par ces effets sont faibles.

La fraction de relaxation se calcule comme $\varphi = A_1 / (A_1 + A_2)$. Si le système relaxe complètement jusqu'à force nulle, $\varphi = 1$. Dans le cas limite inverse, si aucune relaxation ne se produit, $\varphi = 0$. Conformément à la prédiction de notre modélisation, la fraction de relaxation est indépendante de l'amplitude des marches : la dispersion des valeurs de φ entre les marches de différentes amplitudes est de 0,7% dans la direction positive et de 1,6% dans la direction négative, en moyenne sur l'ensemble de nos données. En revanche l'asymétrie de k_{eff} est la source d'une différence de la fraction de relaxation entre les marches positives et négatives. Comme attendu, c'est dans la direction négative, où k_{eff} est le plus important, que la fraction de relaxation est la plus faible. Afin de quantifier l'asymétrie de φ , indépendamment de sa valeur moyenne, on définit le rapport $\alpha = (\langle \varphi_{\text{pos}} \rangle - \langle \varphi_{\text{neg}} \rangle) / \langle \varphi \rangle$ où $\langle \varphi \rangle$ est la moyenne de $\langle \varphi_{\text{neg}} \rangle$ et de $\langle \varphi_{\text{pos}} \rangle$. Sur six expériences, $\langle \alpha \rangle = 10\%$, les valeurs individuelles variant entre moins de 0,2% et 26%.

2 Réponse de moteurs actifs

2.1 Description qualitative

Dans le cas de moteurs actifs, l'amplitude des fluctuations du mouvement de la bille est plus importante (Fig. III.27(a)). Il faut donc effectuer un plus grand nombre de moyennes que lorsque les moteurs sont passifs pour obtenir des signaux exploitables. Cette contrainte allonge la durée du protocole, jusqu'à plusieurs minutes. Le problème que nous mentionnions lors de l'étude des oscillations spontanées se pose à nouveau : il est difficile de trouver une bille dont le mouvement se maintienne sur de telles durées. Nous avons donc diminué le nombre de marches afin de garder un temps d'acquisition raisonnable tout en effectuant un nombre suffisant de répétitions.

Le protocole que nous avons appliqué consiste à imposer au piège des séries de trois marches alternées, d'amplitude croissante égale à 30, 60, et 90 nm dans les deux sens. Ce protocole a pu être appliqué de manière fiable à 12 reprises.

Contrairement à ce que nous observions lors des expériences sans ATP, pour toutes les marches, la bille atteint après un régime transitoire de quelques dizaines de millisecondes une position égale en moyenne à celle du piège (Fig. III.27(b)). Malgré le moyennage de 10 séries de marches, la position de la bille présente toujours des fluctuations importantes autour de la nouvelle valeur moyenne. De manière équivalente, la force retourne à une valeur nulle en moyenne, ce qui signifie qu'en présence d'ATP, les moteurs sont capables de relaxer la force qu'on leur a appliquée.

Le régime transitoire se compose de deux phases : une première phase très rapide, dont la durée est de l'ordre de 500 μ s, comparable à la relaxation observée sans ATP, et une autre phase plus lente, de 20 à 30 ms conduisant à la relaxation complète. Il apparaît clairement que la relaxation de la force est asymétrique entre les deux directions de marche. Aux temps très courts, on voit que l'asymétrie vient du fait que la phase rapide dans le sens positif est responsable d'une fraction de la relaxation totale plus importante que dans le sens négatif (Fig. III.27(c)).

2.2 Durée du régime transitoire

On peut évaluer la durée totale de la relaxation de la manière suivante : l'incertitude sur la valeur finale de la force est estimée en calculant la valeur quadratique moyenne de la force δf lorsque le régime permanent est atteint ; la durée du régime permanent est l'instant T après le début de la marche où $F(T) \leq \delta f$ pour la première fois (Tableau III.1). Afin de comparer la durée de la relaxation dans le sens du mouvement spontané des moteurs et dans le sens opposé, on peut, pour une amplitude de marche donnée, faire le rapport de la durée de la relaxation dans le sens négatif T_- et dans le sens positif T_+ . Ces rapports souffrent malheureusement d'une grande dispersion d'une expérience à l'autre, c'est pourquoi il est difficile de tirer une conclusion claire.

Sur l'ensemble de nos données, les valeurs moyennes (\pm déviation standard) sont les

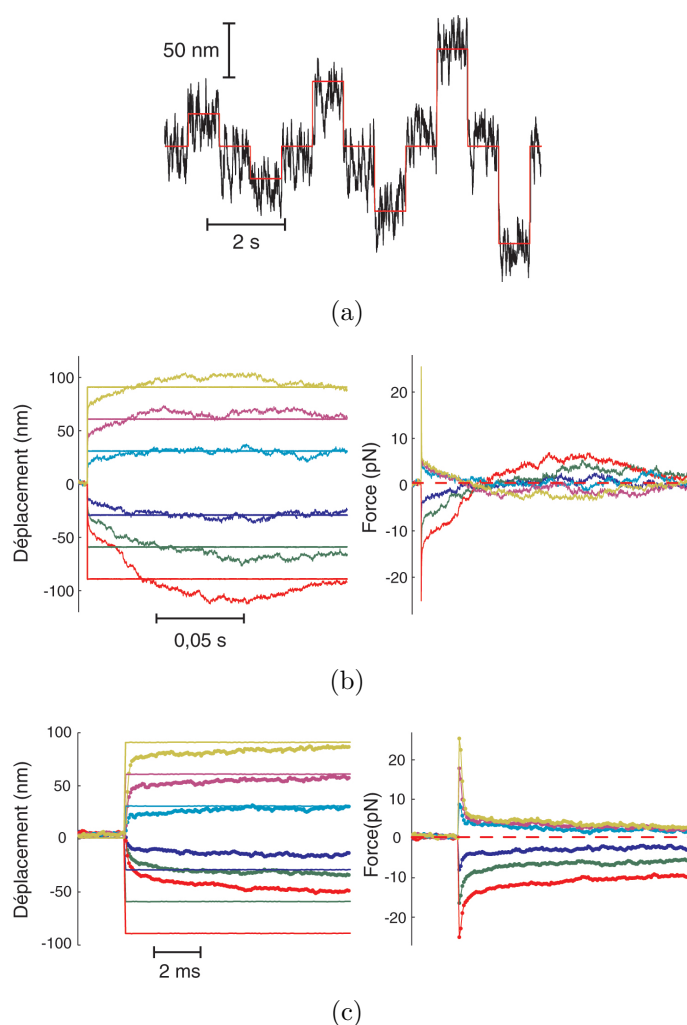


FIG. III.27: Mesure de la réponse d'une assemblée de moteurs actifs à des marches alternées

(a) Extrait des signaux bruts enregistrés : déplacement de la bille (noir) et position du piège (rouge), centrée sur celle de la bille. La bille suit en moyenne le piège, avec d'importantes fluctuations dues à l'activité des moteurs, ce qui impose de moyennner plusieurs séries de marches identiques à celle-ci.

(b) Signaux issus du moyennage de 10 séries de marches. A gauche : superposition des déplacements moyens de la bille (signaux bruités) et du piège (créneaux parfaits) pour chaque marche. Les signaux de même couleur correspondent à une même marche. A droite : force exercée par le piège. Les forces pendant le régime transitoire ne sont pas symétriques entre les marches positives et négatives.

(c) Agrandissement sur la première phase de la relaxation. On observe une asymétrie très prononcée entre la relaxation dans la direction positive et dans la direction négative. Cette asymétrie conduit à des valeurs très différentes de la fraction de relaxation dans les deux sens. En moyenne, $\langle \varphi_{\text{pos}} \rangle = 0,67$ et $\langle \varphi_{\text{neg}} \rangle = 0,40$, ce qui correspond à une variation relative $\alpha = 51\%$. Dans la direction positive, les valeurs de force atteintes à l'issue de la phase rapide sont très voisines, alors que la force initiale est proportionnelle à l'amplitude de la marche Δ , ce qui indique que la fraction de relaxation dépend de l'amplitude de la marche.

N° marche	Marches positives					
	A_1 (pN)	τ_1 (μ s)	A_2 (pN)	τ_2 (ms)	T (ms)	φ
1 (30 nm)	5,25	149	3,19	11,9	18,4	0,38
2 (60 nm)	13,3	123	6,7	13,8	23,7	0,34
3 (90 nm)	21,3	137	8,05	19,1	30	0,27
	Marches négatives					
1 (30 nm)	3,89	114	4,18	11,2	14	0,52
2 (60 nm)	8,06	204	11,5	28,6	67,7	0,59
3 (90 nm)	9,48	105	20,9	21,8	47,2	0,69

TAB. III.1: Résultats de l'analyse du régime transitoire de relaxation sur l'exemple illustré fig. III.27

suivantes :

$$\left\langle \frac{T_{1-}}{T_{1+}} \right\rangle = 3,48 \pm 3,44$$

$$\left\langle \frac{T_{2-}}{T_{2+}} \right\rangle = 2,16 \pm 0,94$$

$$\left\langle \frac{T_{3-}}{T_{3+}} \right\rangle = 2,37 \pm 1,57$$

Toutes les valeurs moyennes sont largement supérieures à 1, mais la barre d'erreur exclut la valeur 1 uniquement dans le cas des marches intermédiaires. Il semble donc que le temps de relaxation soit plus court dans le sens du mouvement spontané des moteurs que dans le sens opposé, mais nos données ne rendent pas cette observation statistiquement certaine.

2.3 Importance relative des deux phases de la relaxation

Sur chaque marche on peut ajuster de manière satisfaisante au signal de force une fonction bi-exponentielle $F(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$, ce qui permet d'étudier quantitativement les contributions relatives des deux phases de la relaxation.

Sur l'exemple présenté plus haut (Tableau III.1), la phase rapide de la relaxation met en jeu des temps caractéristiques de l'ordre de 100 à 200 μ s, et il ne semble pas se dégager de corrélation nette avec le sens ou l'amplitude de la marche. La phase lente dure de 11 à 30 ms, soit 80 à 200 fois plus longtemps que la phase rapide. Par conséquent, les durées totales du régime transitoire varient d'une marche à l'autre de la même manière que le temps caractéristique de la phase lente.

A quoi correspondent ces deux échelles de temps ? On peut supposer que la phase rapide correspond à une relaxation "passive" liée à la friction visqueuse, les moteurs restant fixes comme dans le cas sans ATP. Cette phase rapide serait alors suivie d'une phase lente due à la relaxation de la force par les moteurs effectuant leur cycle mécano-chimique. Si la relaxation rapide est d'origine passive, et que l'élément

élastique sous-jacent est linéaire, la phase rapide devrait être symétrique entre les marches positives et négatives. La figure III.27(c) montre que cela n'est pas le cas. L'asymétrie peut provenir du fait que l'élément élastique est non linéaire. Dans ce cas, l'asymétrie devrait correspondre à celle que nous avons mesurée dans les expériences sans ATP.

De manière analogue au cas sans ATP, on définit la fraction de relaxation $\varphi = A_1/(A_1 + A_2)$ pour déterminer l'importance relative de la phase rapide dans la relaxation totale. φ vaut 1 si la force est entièrement relaxée pendant la phase rapide, et il est nul si la phase rapide n'existe pas. Sur 14 billes différentes⁷, on obtient $\langle\alpha\rangle = 25\%$ les valeurs individuelles s'échelonnant entre 6,4% et 55%. L'asymétrie de la fraction de relaxation lorsque les moteurs sont actifs est donc nettement plus prononcée que dans le cas des moteurs sans ATP ($\langle\alpha\rangle_{(\text{sans ATP})} = 10\%$). Ces résultats semblent indiquer que la phase rapide de la relaxation n'est pas uniquement due à la relaxation passive du système, mais que l'activité des moteurs y joue un rôle.

Il est apparent sur la figure III.27(c) que la fraction de relaxation sur les marches positives dépend de l'amplitude de la marche. Pour étudier la dépendance de φ avec l'amplitude des marches de manière quantitative, nous procédons de la manière suivante : dans chaque direction, on trace les histogrammes de la distribution sur toutes les expériences de φ_1/φ_2 et φ_3/φ_2 , φ_i désignant la fraction de relaxation sur la i -ème marche. Dans la direction positive (Fig. III.28(a)), en moyenne $\varphi_1^+ < \varphi_2^+$, et $\varphi_3^+ > \varphi_2^+$. La différence relative entre φ_1^+ et φ_3^+ , moyennée sur tous les

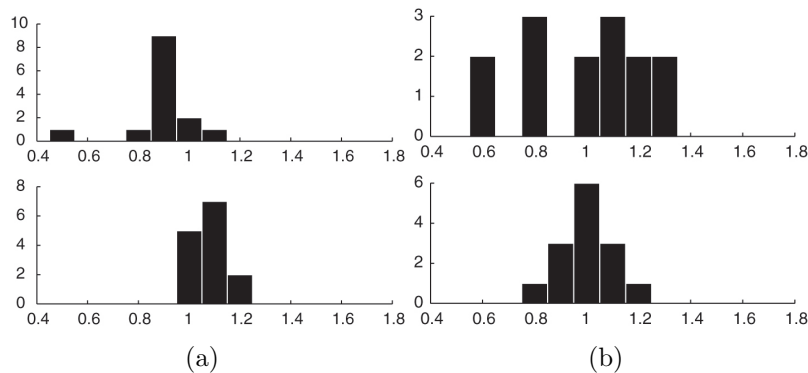


FIG. III.28: **Dépendance de φ avec l'amplitude de la marche**

Dans chaque direction, les fractions de relaxation des marches 1 et 3 sont normalisées à celle de la marche 2.

(a) Histogrammes des valeurs obtenues dans la direction positive pour les marches 1 (en haut ; moyenne $0,89 \pm 0,13$) et 3 (en bas ; moyenne $1,07 \pm 0,06$).

(a) Histogrammes des valeurs obtenues dans la direction négative pour les marches 1 (en haut ; moyenne $0,97 \pm 0,24$) et 3 (en bas ; moyenne $1,00 \pm 0,11$).

enregistrements, vaut 19%. Cet écart est largement supérieur à la dispersion mesurée

⁷12 billes +2 pour lesquelles le taux d'échantillonnage des signaux est de 5 kHz. Cet échantillonnage est trop faible pour estimer correctement τ_1 , mais permet tout de même de mesurer les amplitudes respectives des deux phases A_1 et A_2 .

dans le cas passif (1,6%) Ces données indiquent que plus l'amplitude de la marche est importante dans le sens du mouvement spontané des moteurs, plus la phase rapide participe de manière importante à la relaxation de la force. Dans la direction négative (Fig. III.28(b)), les histogrammes de φ_1/φ_2 et φ_3/φ_2 ne montrent pas de dépendance systématique de φ avec l'amplitude de la marche.

Sur une bille, nous avons réussi à appliquer 15 séries de 10 marches dans chaque direction (Fig. III.30(a)). Sur chaque marche, les moteurs relaxent complètement la force. La relaxation peut se décomposer en deux phases de temps caractéristiques très différents. L'analyse du régime transitoire selon la même méthode, en effectuant des ajustements bi-exponentiels sur toutes les marches, permet de retrouver sur cet exemple les différentes caractéristiques de la relaxation que nous avons extraites de l'analyse statistique effectuée jusqu'ici. Le comportement du système pendant la phase rapide de la relaxation est fortement asymétrique ($\alpha = 33\%$). La figure III.29 montre la variation de la fraction de relaxation, d'une part, et de la durée totale de la relaxation, d'autre part, en fonction de l'amplitude de la marche dans les deux directions. Ces résultats confortent ceux que nous avons obtenus, avec des barres d'erreur importantes, dans la précédente analyse : la durée du régime transitoire est plus courte, et la fraction de relaxation rapide est plus importante, dans la direction positive que dans la direction négative. Dans la direction positive, φ augmente avec l'amplitude de la marche.

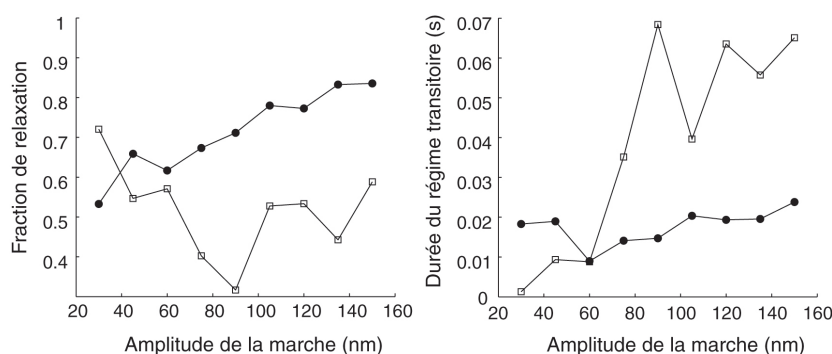


FIG. III.29: Comparaison du régime transitoire de relaxation selon les deux directions de marche

(a) Dans la direction positive (ronds), φ vaut en moyenne 0,71 et croît presque de manière monotone avec l'amplitude de la marche. Dans la direction négative (carrés), la valeur moyenne (0,52) est plus faible, et φ ne présente pas de variation nette en fonction de l'amplitude de la marche.

(b) La durée totale du régime transitoire montre un comportement asymétrique entre les deux directions. Elle est relativement constante dans la direction positive (18 ± 4 ms). Dans la direction opposée, elle augmente avec l'amplitude de la marche, de moins de 10 ms pour les plus petites à 70 ms pour les plus grandes. Notons que la précision de cette mesure est d'autant plus grande que la marche est grande : pour les plus petites marches, les fluctuations en régime permanent sont non négligeables par rapport à la force maximale, ce qui peut significativement altérer la durée mesurée par ce procédé.

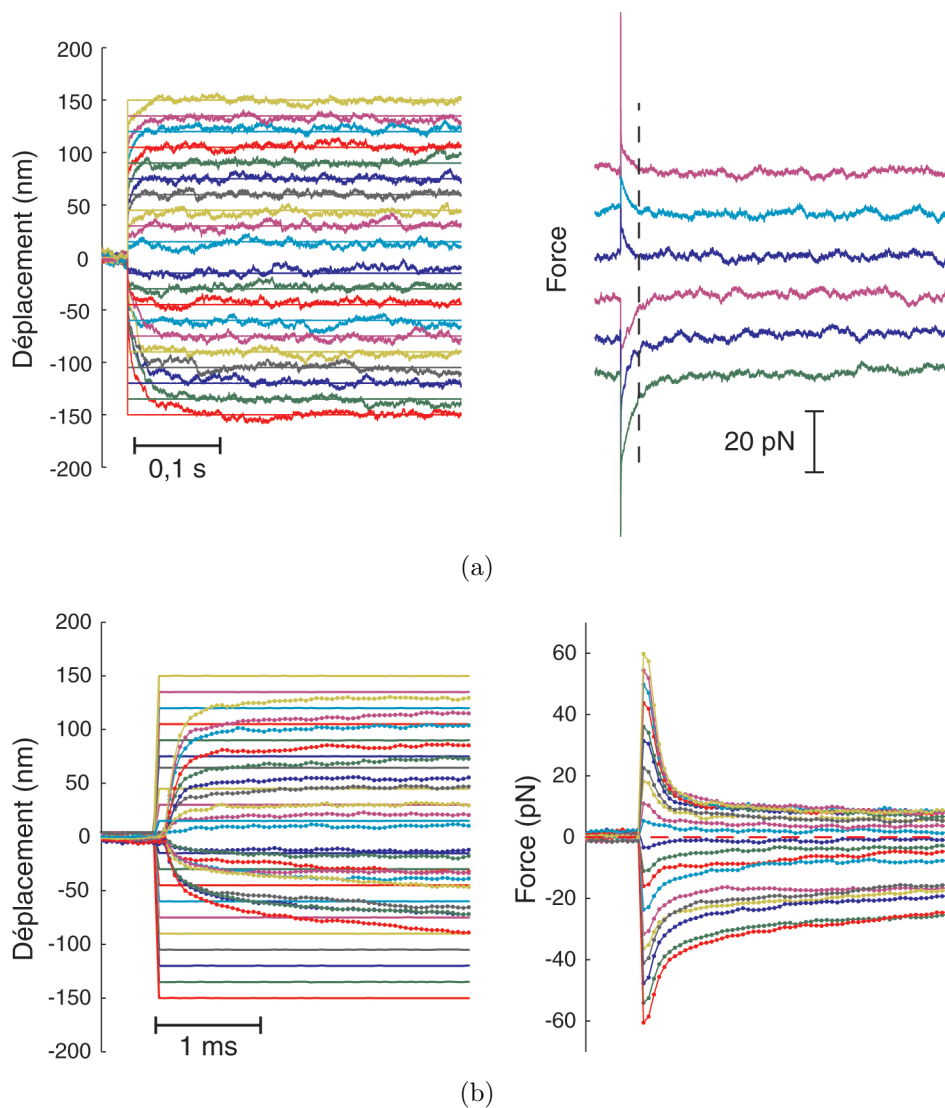


FIG. III.30: **Protocole de mesure d'une relation force-déplacement en boucle ouverte**

(a) Signaux issus du moyennage de 15 séries de 10 marches dans chaque direction. L'incrément en amplitude entre les marches est de 15 nm. A gauche : superposition des déplacements moyens de la bille (signaux bruités) et du piège (créneaux parfaits) pour chaque marche. Les signaux de même couleur correspondent à une même marche. A droite : signaux de force pour trois marches dans chaque direction. Les tirets noirs verticaux soulignent qu'à un instant où la relaxation est achevée sur les trois marches positives, la force n'a pas encore atteint sa valeur asymptotique sur les marches négatives, ce qui indique que la durée de la relaxation est plus longue sur les marches négatives que sur les marches positives.

(b) Agrandissement sur la première phase du régime transitoire. La phase rapide de la relaxation montre une forte asymétrie entre les deux directions, et est responsable d'une plus grande fraction de la relaxation sur les marches positives que sur les marches négatives.

2.4 Temps caractéristique de la phase rapide

Sur l'ensemble de nos données, les temps caractéristiques moyens de la phase rapide sur les marches positives et négatives (\pm déviation standard) sont respectivement $\tau_1^+ = 132 \pm 34 \mu\text{s}$ et $\tau_1^- = 148 \pm 65 \mu\text{s}$. Les deux valeurs sont presque identiques, et sont similaires aux temps de relaxation mesurés sans ATP. Cette observation, au regard du fait que l'activité des moteurs semble intervenir dans la phase rapide de la relaxation, peut surprendre au premier abord. Naïvement, on s'attendrait en effet à ce que les cycles d'accrochage-décrochage des moteurs créent une friction d'origine moléculaire λ_a , qui s'ajoute à la friction hydrodynamique sur la bille et le filament, λ_{eff} . Comme nous l'avons déjà remarqué (*cf* p. 132 et fig. III.20), cette friction moléculaire peut être 5 fois supérieure à la friction hydrodynamique, à force extérieure nulle. Le temps de relaxation serait donné par $\tau_{(\text{ATP})} = \frac{\lambda_{\text{eff}} + \lambda_a}{k_T}$, qui devrait alors être environ 5 fois supérieur à $\tau_{(\text{sans ATP})} = \frac{\lambda_{\text{eff}}}{k_T + k_L}$, puisque $k_T \gg k_L$.

Cette mesure suggère qu'un ensemble de moteurs, opérant au voisinage de sa force d'arrêt, peut atteindre des cinétiques beaucoup plus rapides que celles extrapolées à partir des propriétés des moteurs opérant en l'absence de force extérieure.

3 Relation force-déplacement de moteurs actifs

3.1 Mesure en boucle ouverte

Sur l'exemple où nous avons pu enregistrer 15 séries de 10 marches, il est possible de tracer à différents instants la relation force-déplacement du système étudié. La figure III.31(a) montre les relations obtenues à trois instants différents après le début des marches. Pendant le régime transitoire, l'asymétrie de la relaxation produit une relation force-déplacement monotone mais fortement non linéaire. La courbe mesurée 350 μs après le début de la marche a une pente beaucoup plus forte dans le domaine négatif ($0,45 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$) que dans le domaine positif ($0,06 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$). Après 11 ms, la courbe s'infléchit mais reste asymétrique. Après 80 ms, la relaxation est partout achevée, et la relation force-déplacement est, aux fluctuations près, horizontale égale à 0. L'évolution dans le temps de l'affaissement de l'asymptote de la courbe dans le domaine négatif peut être suivi en mesurant pendant 200 ms une relation force-déplacement toutes les 1 ms. Pour chaque relation force-déplacement, on estime par un ajustement linéaire la pente de l'asymptote, et on trace cette valeur en fonction de l'instant de mesure de la courbe (Fig. III.31(b)). Le comportement obtenu semble correspondre à une décroissance bi-exponentielle, mettant en jeu des constantes de temps de 4 ms pour la contribution la plus rapide et 26 ms pour la plus lente.

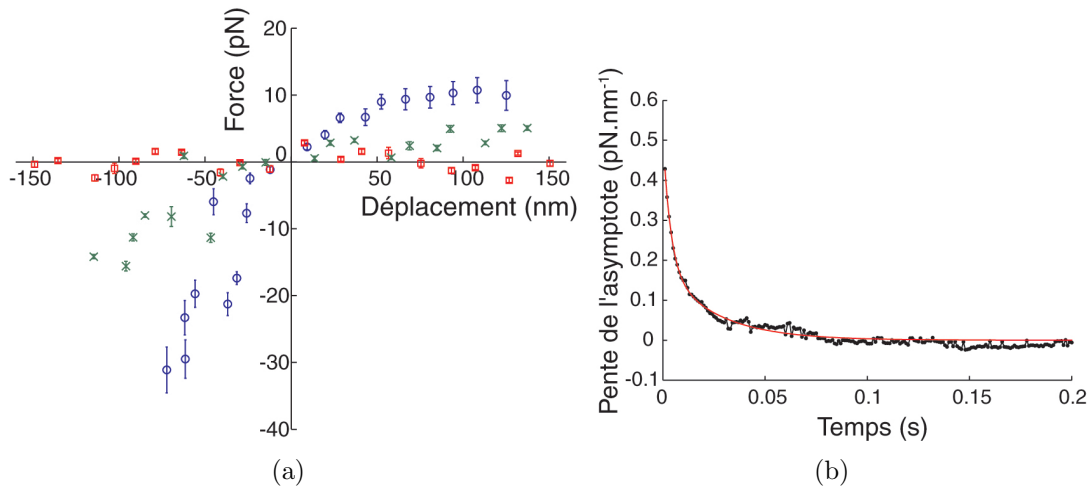


FIG. III.31: **Relation force-déplacement en boucle ouverte d'une assemblée de moteurs**

(a) Relations force-déplacement obtenues en moyennant pour chaque marche le déplacement de la bille et la force exercée par le piège sur une fenêtre temporelle de 2 ms, 350 μ s (ronds bleus), 11 ms (croix vertes) et 80 ms (carrés rouges) après le début des marches.

(b) Variation temporelle de l'asymptote de la relation force-déplacement dans le domaine négatif (en noir) et ajustement d'une fonction bi-exponentielle (en rouge), de constantes de temps 4 ms et 26 ms

3.2 Mesure à déplacement imposé

Sur une seule bille, nous avons pu appliquer 15 séries de 6 marches dans chaque direction, le piège optique étant rétroactionné pour imposer le déplacement de la bille. Après moyennage de toutes les séries, la bille atteint pour chaque marche la position de consigne en 3 ms (Fig. III.32(a)). Aux temps courts, la relation force-déplacement est non linéaire : elle présente deux branches asymptotiques approximativement linéaires, séparées par une zone de raideur beaucoup plus faible (Fig. III.32(b)). Cette relation est également asymétrique, puisque les deux pentes asymptotiques sont différentes. La raideur est plus importante pour les marches négatives que pour les marches positives. Aux temps longs, les moteurs relaxent complètement la force.

Ce résultat est une indication qu'il est possible, sur notre système minimal, d'observer des relations force-déplacement non linéaires.

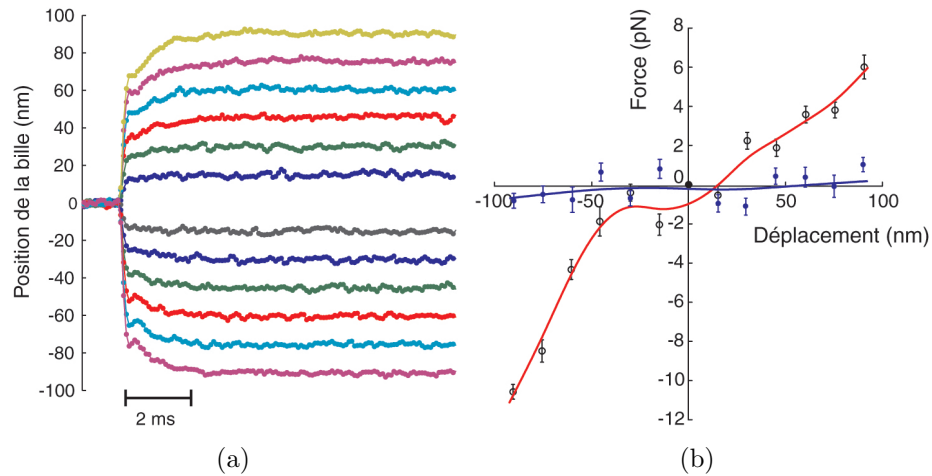


FIG. III.32: Mesure de relation force-déplacement à déplacement imposé d'une assemblée de moteurs

(a) Déplacement de la bille, moyenné sur 15 répétitions, pour chaque marche. 6 marches sont effectuées dans chaque direction, l'incrément entre deux marches consécutives étant de 15 nm. La bille atteint la position de consigne après 3 ms.

(b) Relations force-déplacement obtenues en moyennant pour chaque marche la force sur une durée de 5 ms. 3 ms après le début des marches (cercles noirs et ligne rouge), la relation force-déplacement est non linéaire. Les valeurs asymptotiques des pentes sont de $0,18 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ pour les marches négatives, et $0,086 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ pour les marches positives. Une zone beaucoup plus souple, large d'environ 50 nm, sépare les deux asymptotes. Après 70 ms (ronds bleus et ligne bleue) après le début de la marche, la force est complètement relaxée pour toutes les marches.

D Discussion

1 Oscillations mécaniques du système acto-myosine

1.1 Mouvement spontané

Nos résultats expérimentaux montrent qu'une collection de quelques dizaines de HMM, fragments actifs de myosines II, soumise à une force de rappel élastique s'opposant à la force active produite par les moteurs, présente un comportement spontanément oscillatoire, à des fréquences caractéristiques de 2 à 14 Hz (Fig.III.6). Nous avons remarqué que l'amplitude caractéristique de ces mouvements oscillants, de 10 à 80 nm, est grande devant le déplacement produit par une molécule individuelle ($\sim 5 \text{ nm}$). Dans certaines conditions, que nous n'avons pas précisément définies, les oscillations peuvent être régulières. Elles peuvent alors reproduire les formes et fréquences caractéristiques des oscillations mécaniques spontanées observées dans les fibres musculaires (Fabiato et Fabiato, 1978; Okamura et Ishiwata, 1988), qui sont triangulaires asymétriques avec une phase lente dans la direction du mouvement naturel des moteurs en l'absence de force, et une phase rapide dans la direction opposée, ou la forme de celles observées dans les touffes ciliaires des cellules ciliées

de l'oreille interne des vertébrés (Martin et coll., 2003), qui sont rectangulaires (Fig. III.5, (a) et (b)).

Remarquons qu'une configuration expérimentale similaire à celle que nous avons utilisée a été produite dans trois études antérieures, étudiant l'interaction de HMM du muscle de lapin avec un filament d'actine lié à son extrémité à une bille fonctionnalisée par de la gelsoline. Dans le premier cas (Miyata et coll., 1995), la densité de HMM sur la surface est très inférieure à la nôtre (incubation à $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), le but de l'expérience étant de mesurer la force produite par un pont acto-myosine individuel. Une autre étude implique un plus grand nombre de moteurs (incubation à $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); les résultats présentés montrent que l'interaction entre un filament et des HMM donne lieu, comme dans nos expériences, au développement d'une force ($\sim 25 \text{ pN}$), mais sans qu'un mouvement oscillatoire soit observé (Fig. III.33(a), (Kawai et coll., 2000)). Pourtant, la variance du signal de position de la bille augmente lorsque le filament d'actine est mis au contact des HMM (Fig. III.33(a)); un tel comportement traduit probablement l'activité mécanique des moteurs. Il est possible que le signal mesuré soit le résultat d'un sous-échantillonnage d'un mouvement fluctuant similaire à ceux que nous avons observés. En effet, dans ces expériences, le mouvement de la bille piégée est mesuré par analyse d'images sur des films avec une résolution temporelle de 30 images par secondes. La bande passante du système de

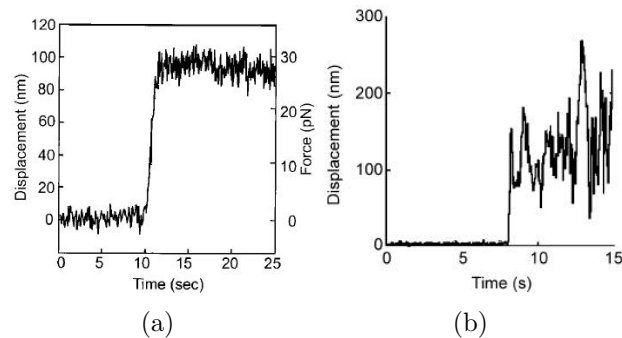


FIG. III.33: Résultats obtenus dans des configurations expérimentales similaires

(a) Interaction d'un filament d'actine nu avec des HMM développant une force stationnaire de 25 pN (raideur du piège $0,29 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$). Extrait de (Kawai et coll., 2000).

(b) Interaction d'un filament fin reconstitué (actine+troponine-tropomyosine) avec des HMM développant une force moyenne fluctuante de 10 pN (raideur du piège $0,08 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$). Extrait de (Kawai et coll., 2006).

détection est donc seulement de 15 Hz , ce qui pourrait conduire à un filtrage d'un mouvement réellement oscillant à des fréquences de plusieurs Hertz. La résolution spatiale, non précisée, est également probablement plus faible que celle que nous obtenons dans nos expériences avec un détecteur de position utilisant une photodiode. Néanmoins, dans des cas où le mouvement fluctuant de la bille est lent ($\sim 1 \text{ Hz}$) et de grande amplitude, la détection vidéo peut être suffisante pour le mesurer (Fig. III.33(b), (Kawai et coll., 2006)).

1.2 Force à vitesse imposée

Les mesures de relation force-vitesse effectuées sur les muscles, ou sur des myosines *in vitro*, que nous avons mentionnées au chapitre I, sont généralement effectuées en imposant une force et en mesurant la vitesse du mouvement produit par les moteurs sous cette charge. Nos expériences constituent une tentative de mesure de la relation force-vitesse d'une assemblée de myosines **à vitesse imposée**, où on cherche à mesurer la force nécessaire pour imposer une vitesse donnée à un filament d'actine interagissant avec une assemblée de moteurs. L'avantage de cette approche est qu'elle permet de décrire, si elle existe, une zone de pente négative dans le diagramme force-vitesse, alors que cette zone serait instable si on travaillait à force imposée.

Un point délicat, et une surprise, de ces expériences est l'observation que la force exercée par le piège peut contenir une composante élastique (Fig. III.17), ce qui implique qu'on ne peut pas associer dans ces cas-là une force stationnaire à une vitesse imposée. Nous avons néanmoins remarqué que cette contribution élastique apparaît toujours sur les rampes de direction opposée au mouvement naturel des moteurs. Cette observation fournit une information sur le comportement des moteurs soumis à une sollicitation extérieure. En effet, il est peu probable que l'élément élastique soit produit par des "têtes HMM mortes" ou d'autres liens permanents : dans le cas où les moteurs sont ancrés à l'actine dans l'état *rigor*, on observe également l'existence d'un lien élastique, mais celui-ci est présent que la vitesse imposée à la bille soit positive ou négative (Fig. III.11). Dans ce cas, la faible raideur associée à l'élément élastique suggère que les myosines constituent un ancrage rigide du filament d'actine, dont on sonde l'élasticité. Le fait qu'en présence d'ATP on n'observe d'élément élastique que dans la direction négative, avec de plus une rigidité comparable à celle de l'élément élastique mesuré sans ATP, suggère qu'une fraction des myosines se "bloque" lorsqu'on s'oppose à leur mouvement naturel. Des expériences de molécule unique indiquent en effet que la myosine peut se comporter comme une molécule mécanosensible, présentant un temps d'accrochage à l'actine qui croît exponentiellement avec la force appliquée, lorsque celle-ci a un sens opposé à celui du coup de force (*cf* chapitre I).

Pour qu'un élément élastique apparaisse, il n'est pas nécessaire que l'ancrage du filament soit permanent. Il suffit qu'il ait une durée de vie caractéristique supérieure à la durée des rampes. D'ailleurs, nos mesures de réponse à des marches alternées indiquent que le système acto-myosine relaxe complètement la force qui lui est appliquée, et donc que les moteurs sont capables de se décrocher même si à temps court ils ont subi une force qui s'oppose à leur coup de force.

Remarquons également qu'il suffit d'une seule myosine "bloquée" pour que l'on sonde l'élasticité du filament d'actine ; on ne mesure pas l'élasticité de la myosine, car elle est bien plus rigide. Si tous les moteurs étaient bloqués, la réponse du système acto-myosine devrait, en présence d'ATP, reproduire le comportement mesuré en l'absence d'ATP. La soustraction de la contribution élastique à la force mesurée nous a permis d'estimer la contribution de la force totale dépendant de la vitesse. La relation force-vitesse correspondante est radicalement différente de la relation

mesurée sans ATP avec la même méthode, et parfois sur la même assemblée de moteurs, puisqu'elle est non linéaire et présente même une zone de pente négative (Fig. III.23). Ces différences trahissent l'activité mécanique de la fraction de moteurs libres de décrire leur cycle mécano-chimique.

Comment expliquer que certains moteurs se bloquent et d'autres non ? La méthode que nous employons pour fixer les moteurs sur la surface ne permet pas de contrôler leur adsorption, ni donc leur orientation. Il est possible qu'en fonction de leur orientation, certains moteurs soient plus contraints que d'autres en réponse à un mouvement donné de la bille et du filament d'actine, et soient donc davantage susceptibles d'être bloqués.

Sur les rampes positives, la force mesurée croît exponentiellement avec des temps caractéristiques qui décroissent quand la vitesse augmente (Fig. III.20). Le temps caractéristique du régime transitoire vaut $\tau = \lambda_a(v)/k_l$, où k_L est la raideur de l'élément élastique en série entre la bille et les moteurs, et $\lambda_a(v)$ désigne la friction effective produite par les moteurs. Une manière de modéliser cette friction est d'écrire $\lambda_a(v) = Nk_m\tau_{on}(v)$ (Howard, 2001), où N est le nombre de moteurs impliqués, k_m la raideur de l'accrochage moteur-actine, et τ_{on} la durée moyenne de l'accrochage d'un moteur. Si on considère que k_l est constant (on peut même mesurer cette valeur sur les rampes négatives), la diminution de τ reflète la diminution de τ_{on} lorsque la vitesse augmente, phénomène que nous avons déjà mentionné au chapitre I comme responsable de l'effet Fenn dans les muscles.

1.3 Point de fonctionnement

Sur 4 des 6 cas où nous avons pu mesurer la relation force-vitesse caractéristique du système acto-myosine, nous avons observé que le point de vitesse nulle, à la force d'arrêt, se trouve au bord de la zone de pente négative. En l'absence de fluctuations, on n'observerait d'oscillations que si ce point était à l'intérieur de cette zone instable. En présence de fluctuations, si le point de vitesse nulle est à proximité de la zone de pente négative, on s'attend à pouvoir toujours décrire des cycles autour de la zone de pente négative, mais les oscillations ainsi obtenues seront irrégulières, comme nous l'avons observé. Il est à noter que nous n'avons pas été capables de mesurer de relation force-vitesse dans le cas d'une oscillation rythmique, pour lequel on s'attendrait à ce que le point de fonctionnement soit positionné à l'intérieur de la zone de pente négative.

Dans la mesure où ne sommes pas parvenus à contrôler les conditions donnant lieu à des oscillations régulières, il est difficile de savoir si nous avons simplement joué de malchance, ou si dans les conditions expérimentales qui sont les nôtres, il existe une raison fondamentale imposant que le point d'équilibre des moteurs soit au bord de la zone instable.

En effet, on peut remarquer que dans les fibres musculaires, les oscillations spontanées de tension ou de contraction ne sont observées que dans des conditions d'activation partielle, par le calcium ou par l'ADP, mais pas en activation totale, qui correspond davantage aux conditions dans lesquelles nous travaillons. Il pourrait être

intéressant d'étudier comment l'ajout d'ADP et de phosphate inorganique modifie le comportement des moteurs dans notre configuration expérimentale.

1.4 Rôles des accrochages non productifs

La possibilité qu'une instabilité dynamique dans les systèmes de moteurs puisse provenir d'un comportement non-monotone de la relation force-vitesse a été pour la première fois suggérée par C. Brokaw (Brokaw, 1975). Dans cette étude, les moteurs sont décrits sur la base du modèle du coup de force (Huxley, 1957; Howard, 2001), que nous avons présenté au chapitre I, avec l'ajout d'une possibilité de détachement des moteurs sans production de force, selon une réaction inverse de l'attachement conventionnel; le taux de détachement par cette voie (f' sur la figure III.34(a)) devient particulièrement important lorsque la vitesse du filament d'actine est négative (la direction positive correspondant à la contraction du muscle, donc à la direction positive que nous avons définie), ce qui peut amener les moteurs dans une situation où la distorsion qu'ils subissent est trop importante.

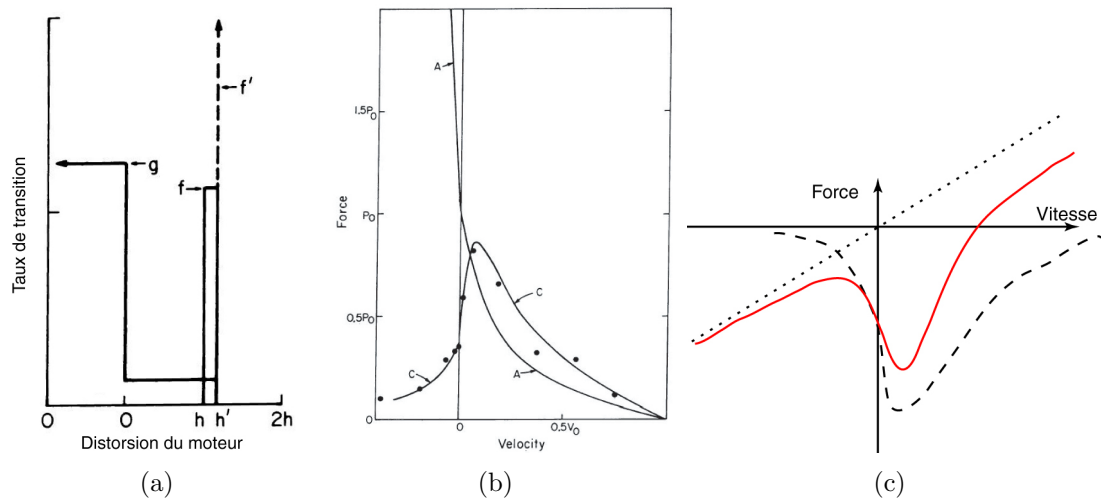


FIG. III.34: **Modèle du coup de force incorporant les accrochages non productifs**

(a) Dépendance des taux de d'accrochage (f), de décrochage par la fixation d'ATP (g) et de décrochage sans production de force (f') en fonction de la position relative du filament d'actine et du moteur

(b) Relation force-vitesse calculée avec les taux de transition du modèle originale de A.F.Huxley (courbe A) et avec les taux de transition illustrés en (a) (courbe C et points).

(a) et (b) : adaptés de (Brokaw, 1975)

(c) Lorsqu'on additionne la force à exercer pour compenser la force des moteurs (en tirets, opposée de la courbe C de la figure (b)) avec une friction passive inhérente au système de mesure (en pointillés), on obtient une relation force-vitesse semblable à celles issues de nos expériences.

Cette modification du modèle entraîne une diminution de la force exercée par l'assemblée de moteurs lorsque la vitesse est faible ou négative. L'utilisation d'un taux d'attachement (f) très localisé a également pour conséquence que le maximum

de la force n'est pas au point de vitesse nulle, mais décalé vers les vitesses positives. Ces deux tendances produisent une relation entre la force active des moteurs et la vitesse du filament d'actine présentant un domaine croissant (Fig. III.34(b)). Aux grandes vitesses positives et négatives, la force produite par les moteurs devient nulle, ce qu'on peut interpréter comme le fait que le filament défile trop vite pour que les moteurs s'y attachent. La force à exercer sur le système pour maintenir une vitesse constante est l'opposée de la relation entre la force active des moteurs et la vitesse. Si on y ajoute la friction venant d'autres éléments passifs, on obtient une courbe force extérieure-vitesse d'allure semblable à celles que nous mesurons (comme illustré sommairement figure III.34(c)).

Le choix de la dépendance spatiale des taux de transition est arbitraire dans ce type de modèle; néanmoins, comme nous l'avons vu au chapitre I, l'existence d'accrochages non productifs a reçu le soutien de plusieurs études expérimentales. L'augmentation de la probabilité d'accrochages non productifs lorsque la vitesse est négative pourrait expliquer, dans nos expériences, pourquoi la force à exercer sur les moteurs diminue en valeur absolue, conduisant à la région de pente négative que nous observons dans nos relations force-vitesse.

1.5 Comparaison avec les modèles théoriques

Nous avons exposé au chapitre I (p. 55) différentes descriptions théoriques du comportement collectif de moteurs moléculaires.

Un premier modèle est basé sur l'existence de trois états possibles pour les moteurs, un détaché de l'actine et deux liés à l'actine, les taux de transitions entre les deux états attachés étant dépendants de la force appliquée au moteur. (Duke, 1999; Vilfan et Duke, 2003). Les oscillations spontanées obtenues par ce modèle ont une amplitude déterminée par la taille du changement conformationnel associé au coup de force d'un moteur individuel; elles sont donc de l'ordre de quelques nanomètres. Le fait que nous observions des mouvements oscillants de plusieurs dizaines de nanomètres d'amplitude semble difficile à interpréter par ce modèle.

Un autre modèle décrit la possibilité d'obtenir des oscillations spontanées du système acto-myosine, en utilisant pour les moteurs des taux de détachement dépendants de la force (Günther et Kruse, 2007; Grill et coll., 2005). Dans ce modèle la relation force-vitesse des moteurs est linéaire, ce qui ne semble pas correspondre avec nos mesures de réponse à des rampes alternées.

Enfin, un modèle à deux états a été proposé (Jülicher et Prost, 1995; Jülicher et Prost, 1997), où les moteurs effectuent des transitions hors d'équilibre entre deux potentiels, représentant respectivement un état détaché et un état attaché à l'actine. Dans ce dernier cas, les moteurs exercent une force déterminée par la dérivée locale du potentiel. Dans ce modèle, l'assemblée de moteurs peut être caractérisée par une relation force-vitesse non monotone, qui entraîne naturellement l'apparition d'oscillations spontanées si le système est couplé à un élément élastique. Les oscillations sont donc fondées sur une instabilité dans le diagramme force-vitesse, et l'amplitude des oscillations n'est en conséquence pas limitée à l'ordre de grandeur

du mouvement produit par un moteur individuel. Ces deux caractéristiques sont en bon accord avec nos résultats. La présence d'une contribution élastique dans la système à des rampes de vitesses opposées à la direction du mouvement naturel des moteurs ne semble cependant pas s'expliquer par ce modèle en l'état actuel. Des travaux théoriques sont actuellement menés au laboratoire par Thomas Guérin et Jean-François Joanny pour tenter d'interpréter cette observation sur la base de ce modèle.

2 Réponse à des marches

2.1 Temps de relaxation des moteurs

Les mesures de réponse de moteurs à des marches alternées du piège montrent que quelle que soit l'amplitude et la direction de la marche, c'est-à-dire quelle que soit la force supplémentaire imposée, le système relaxe vers un état où la force exercée est égale à la force avant la marche.

La durée totale de la relaxation est cependant plus importante dans le sens opposé au mouvement naturel des moteurs en l'absence de force (sens négatif), que dans le même sens que celui-ci (sens positif). Cela se vérifie particulièrement sur l'exemple du système dont nous avons mesuré la relation force-déplacement (Fig. III.29(b)).

La relaxation comprend deux phases. La phase rapide met en jeu des temps caractéristiques τ_1 de 100 à 300 μs . La deuxième phase a un temps caractéristique τ_2 variant de 10 à 60 ms, qui détermine la durée totale de la relaxation. On pourrait penser que cette séparation d'échelle de temps correspond à deux processus distincts, une relaxation passive et rapide, liée à la friction du système, suivie d'une relaxation lente correspondant à un mouvement actif des moteurs. L'asymétrie de la fraction de relaxation due à la phase rapide entre les marches positives et négatives, beaucoup plus importante en présence qu'en l'absence d'ATP, indique au contraire que l'activité des moteurs intervient dans la phase rapide. De plus, si la phase rapide était contrôlée par la friction passive du système, regroupant la friction hydrodynamique et la friction moléculaire, plus importante, due aux moteurs, on s'attendrait à observer des temps caractéristiques plus lents en présence qu'en l'absence d'ATP. Or les temps caractéristiques de la phase rapide de la relaxation sont comparables à ceux mesurés sans ATP.

Un calcul naïf pour déterminer le temps caractéristique τ de moteurs sur une échelle de longueur d consiste à diviser d par la vitesse moyenne v d'un filament mesurée en test de motilité. Avec $d = 10 \text{ nm}$ et $v = 10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, on obtient $\tau = 1 \text{ ms}$, ce qui est bien supérieur aux temps que nous mesurons. La valeur de vitesse utilisée caractérise le mouvement des moteurs en l'absence de force. Nos expériences indiquent qu'à proximité de la force d'arrêt, la dynamique collective des moteurs leur permet d'atteindre des temps caractéristiques beaucoup plus faibles.

Extrapolée au cas de la myosine 1c, une telle aptitude ouvrirait en particulier des perspectives intéressantes quant à son implication dans le processus d'adaptation par les cellules ciliées de l'oreille interne des vertébrés. Dans les cellules ciliées de la cochlée du rat, les constantes de temps les plus rapides de l'adaptation, τ_f ,

sont de l'ordre de 150 μs , en réponse à un déplacement de la touffe ciliaire de 180 nm (Kennedy et coll., 2003). Compte tenu de la configuration géométrique de la touffe ciliaire, il existe un facteur d'amplification entre les mouvements de l'appareil de transduction le long des stéréocils et le déplacement de la touffe ciliaire (Martin, 2008). Un déplacement de la touffe ciliaire de 180 nm correspond donc à un mouvement d'environ 10 nm au niveau des canaux de transduction. Si on considère que l'adaptation est achevée après une durée égale à $3\tau_f$, la vitesse correspondante vaut environ $20 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est entre 50 et 1000 fois supérieur aux vitesses de filaments entraînés par des myosines 1c en test de motilité *in vitro* (de $30 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Gillespie et coll., 1999) à $400 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$, (Zhu et coll., 1996)). Nos expériences ont été effectuées sur la myosine II, mais il se pourrait que les propriétés que nous avons mises en évidence sur ce moteur soient plus générales, et que des collections de myosines 1c aient également, au voisinage de leur force d'arrêt des propriétés dynamiques qui ne puissent pas être inférées à partir de leur comportement en l'absence de force. Dans ce cas, le raisonnement naïf ci-dessus ne serait pas en contradiction avec une implication des myosines 1c dans la phase rapide de l'adaptation.

2.2 Non-linéarité de la relation force-déplacement

En raison de l'asymétrie de la relaxation, la relation force-déplacement en boucle ouverte que nous avons obtenue est non linéaire. Sur un autre système, nous avons également pu mesurer la relation force-déplacement à déplacement imposé. La courbe que nous avons obtenue est également fortement non-linéaire, avec un assouplissement à proximité de la zone centrale (Fig. III.32). Cet assouplissement pourrait être une conséquence de la mécanosensibilité des myosines II, comme nous l'avons détaillé au chapitre I. Ces résultats sont très préliminaires et nécessitent d'être reproduits. Ils constituent une première indication qu'il pourrait être possible, sur le système minimal que nous avons utilisé, de mesurer un comportement non-linéaire de la courbe force-déplacement similaire à celui de la courbe T_2 de la réponse des muscles à des changements abrupts de longueur (Huxley et Simmons, 1971), et de la relation force-déplacement non monotone de la touffe ciliaire des cellules ciliées (Martin et coll., 2000), deux systèmes reposant sur l'action de groupes de moteurs moléculaires.

Il serait également intéressant de pouvoir mesurer sur la même bille la relation force-vitesse et la relation force-déplacement, afin d'étudier dans quelle mesure la non-linéarité de ces deux caractéristiques des propriétés mécaniques du système acto-myosine sont corrélées.

3 Améliorations et perspectives

Les résultats que nous avons exposés ne constituent que le point de départ de l'étude *in vitro* du comportement collectif de moteurs moléculaires. Nous avons mis en évidence l'existence d'une instabilité oscillatoire d'une assemblée de myosines non processives, liée à un comportement non linéaire et non monotone de la relation force-vitesse du système.

Les mouvements oscillatoires observés sont de différentes formes, et sont plus ou moins réguliers. Un point fondamental est d'éclaircir les paramètres qui déterminent les caractéristiques des oscillations, et de les corrélérer à la position de la force d'arrêt par rapport à la zone instable de la relation force-vitesse. A ce titre, comme nous l'avons déjà mentionné, il pourrait être particulièrement intéressant de reproduire *in vitro* les conditions d'activation partielle dans lesquelles des oscillations régulières et durables sont observées dans les myofibrilles.

Nous avons par ailleurs étudié la relaxation d'un système de moteurs en réponse à des marches de déplacement, et mis en évidence une asymétrie du comportement du système selon la direction des marches. En conséquence, la relation force déplacement, mesurée en boucle ouverte, est non-linéaire. Il serait souhaitable de pouvoir mesurer sur un même système la relation force-vitesse et la relation force-déplacement, afin de voir dans quelle mesure les non-linéarités de l'une et de l'autre sont corrélées. Ces expériences sont matériellement réalisables avec notre instrumentation, mais nous ne sommes pas parvenus à les effectuer jusqu'à présent, en raison des difficultés récurrentes que nous avons rencontrées pour obtenir un système oscillant sur des durées suffisamment longues qui permettent d'appliquer consécutivement les deux protocoles.

Pour cette raison, il paraît souhaitable d'améliorer la configuration expérimentale que nous avons utilisée, afin de lui donner plus de robustesse. Dans le système l'élément le plus fragile est selon les cas soit le filament d'actine soit la connexion bille-actine. En général, le mouvement observé s'arrête soit parce que le filament est brisé en plusieurs fragments, comme ce qu'on observe couramment en test de motilité, soit parce que les moteurs exercent une force trop importante qui détache le filament de la bille. Pourtant, les modèles théoriques montrent qu'on a intérêt à avoir le plus grand nombre possible de moteurs si on veut augmenter la cohérence des oscillations. Une première idée serait de remplacer le filament d'actine unique par un stéréocil de touffe ciliaire démembré. En effet, ces stéréocils sont constitués d'un faisceau de filaments d'actine parallèles rigidifié par des protéines de liaison. Des expériences préliminaires nous ont permis d'obtenir des stéréocils démembrés collés sur une lamelle de verre préalablement couverte de polylysine. Le problème, que nous n'avons pas résolu, est de redécoller ces stéréocils de la lamelle, afin de les amener au contact de moteurs. Quelques essais, peu reproductibles, utilisant de la trypsine pour décoller les stéréocils nous ont malgré tout permis de constater qu'un stéréocil en solution est piégeable directement par une pince optique. Cette propriété permettrait de travailler sans bille, et ainsi d'éliminer les problèmes de lien en série entre la bille et les moteurs.

Une autre piste à explorer serait de mieux contrôler la disposition des moteurs, ainsi que leur nombre. Enfin, nous avons utilisé dans nos expériences des myosines II par commodité, car il est relativement aisé de s'en procurer. Néanmoins, le modèle de comportement collectif de moteurs qui semble le mieux rendre compte de nos observations ne se base que sur des propriétés générales des moteurs. Il serait du plus grand intérêt de reproduire ces expériences avec d'autres types de moteurs, par exemple, la myosine 1c, moteur présent dans les touffes ciliaires oscillantes, ou encore des moteurs processifs, kinésine ou myosine V. Dans le cas de la myosine 1c, il serait intéressant d'étudier comment le calcium agit sur les mouvements collectifs observés.

E Un autre type de mouvement généré par les moteurs

1 Observations expérimentales

En appliquant un protocole identique à celui conduisant à l'observation des oscillations induites par les moteurs, nous avons pu à plusieurs reprises observer un phénomène qualitativement différent, dont un exemple est illustré figure III.35. Selon les deux axes de la photodiode, la bille a un mouvement oscillatoire régulier (Fig. III.35(a)), de 28 nm d'amplitude pic-à-pic. Ce mouvement produit un pic très prononcé dans le spectre de puissance (Fig. III.35(b)), centré à 0,8 Hz et très bien défini ($Q = 8,6$)⁸. L'autocorrélation du signal montre également que la cohérence de phase des oscillations est très grande. Il ne s'agit cependant pas du même phénomène que celui discuté dans la partie précédente. Le tracé de la trajectoire de la bille dans le plan XY (Fig. III.35(c)) n'a pas une forme allongée "en cigare" comme nous l'avons observé précédemment, mais une forme circulaire, bruitée par les fluctuations intrinsèques de la bille. Le déphasage entre les signaux selon X et Y, au voisinage du pic fréquentiel, vaut en moyenne 89°. Ces deux observations indiquent que la bille a dans ce cas un mouvement de rotation quasi-circulaire, qui projeté sur deux axes orthogonaux donne des signaux oscillants à une pulsation égale à la vitesse de rotation de la bille.

Contrairement aux oscillations que nous avons étudiées plus haut, ces mouvements de rotation se maintiennent sur plusieurs minutes, ce qui nous permet facilement d'étudier l'influence des paramètres contrôlables. La figure III.36 montre l'effet de la raideur du piège sur le système déjà présenté figure III.35. Les signaux temporels à différentes raideurs de piège font clairement apparaître, outre une augmentation des fluctuations de la bille, une augmentation de l'amplitude des oscillations lorsque la raideur diminue (Fig. III.36(a)), de 12 nm pour la raideur de piège la plus

⁸Le facteur de qualité réel est peut-être même plus important. En effet, le pic n'est composé que de trois points, ce qui signifie que l'estimation de la finesse du pic est limitée par la résolution fréquentielle du spectre de puissance. Celle-ci est déterminée par la longueur du signal temporel ; pour une durée d'acquisition de 20 s, la résolution est de 0,05 Hz.

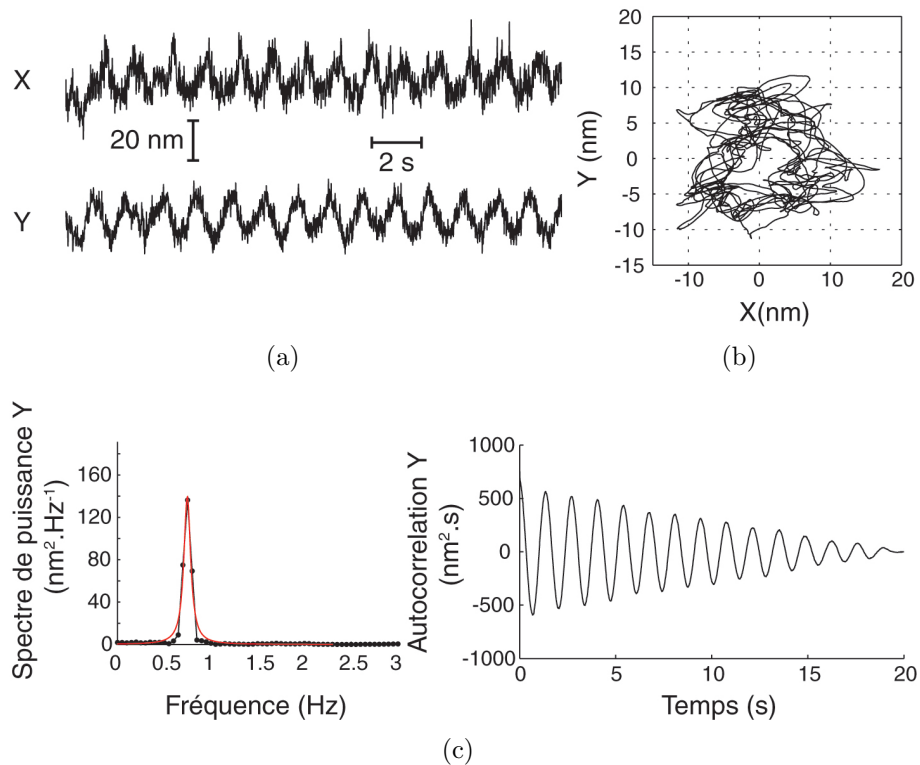


FIG. III.35: **Rotation de la bille induite par les moteurs**

(a) Signaux obtenus sur les deux voies de la photodiode, après une moyenne glissante sur une fenêtre temporelle de 10 ms. La valeur quadratique moyenne vaut environ 6 nm sur chaque voie

(b) Trajectoire correspondante de la bille dans le plan XY, obtenue à partir des signaux (a) moyennés sur 50 ms.

(c) A gauche : spectre de puissance (noir) et ajustement d'une lorentzienne (rouge) (fréquence centrale $f_0 = 0,8$ Hz, facteur de qualité $Q = 8,6$) A droite : fonction d'autocorrélation du déplacement de la bille selon l'axe Y.

forte à 92 nm pour la plus faible. Il est difficile de déceler un quelconque effet sur la fréquence en regardant uniquement les signaux temporels. Néanmoins, le tracé des spectres de puissance, ramenés à la même échelle en les normalisant à leur valeur maximale (Fig. III.36(b)), montre que le pic se décale vers les basses fréquences lorsque la raideur diminue. La variation de fréquence entre les valeurs maximale et minimale de raideur est faible (0,15 Hz), mais le facteur de qualité extrêmement élevé des oscillations permet d'observer ce décalage sans équivoque.

Nous avons observé ce genre de mouvement rotatoire sur 13 systèmes différents. Dans tous les cas les fréquences de rotation sont faibles, de 0,2 à 2,5 Hz. La dépendance de l'amplitude et de la fréquence de rotation avec la raideur du piège sur l'ensemble de nos données confirme ce que nous avons observé sur l'exemple précédent : l'amplitude décroît lorsque la raideur du piège augmente (Fig. III.36(c)), et la fréquence augmente avec la raideur du piège (Fig. III.36(d)). Il est à noter que dans

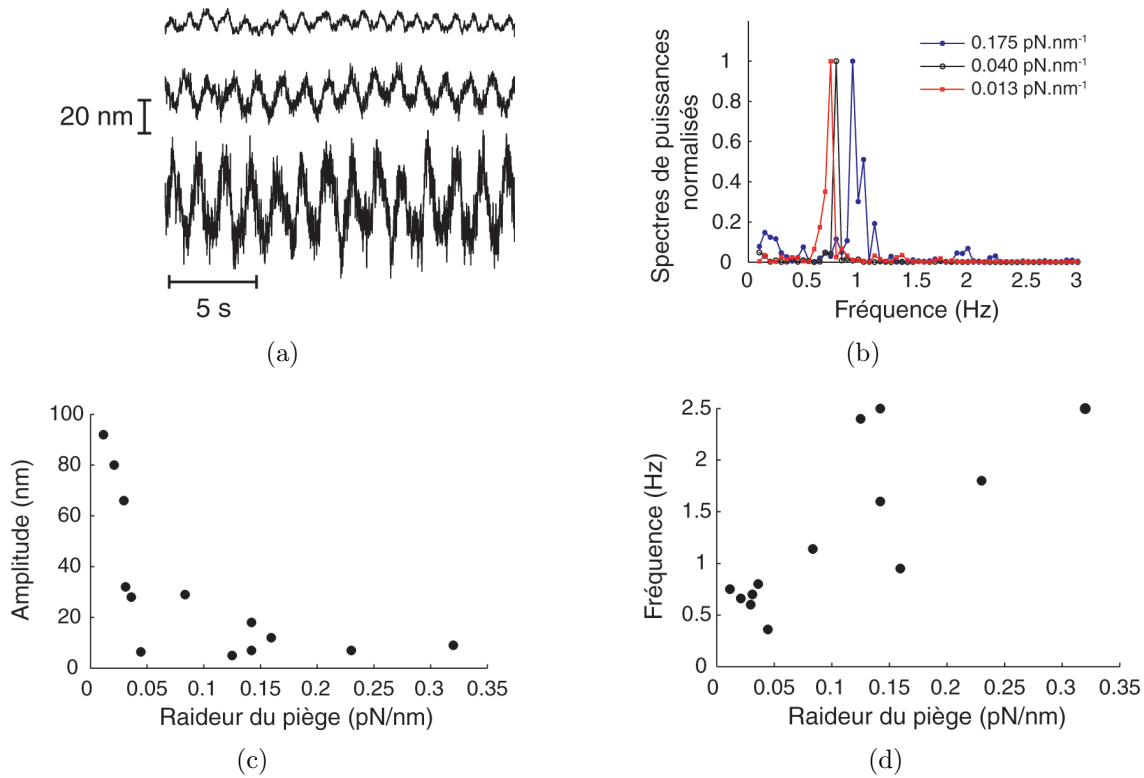


FIG. III.36: **Influence de la raideur du piège sur le mouvement de rotation**

(a) Déplacement de la bille dans la direction Y, après une moyenne glissante sur une fenêtre temporelle de 10 ms, avec un piège de raideur $0,175 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$ (en haut), $0,04 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$ (au milieu, même signal que Fig. III.35(a)), et $0,013 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$ (en bas).

(b) Spectres de puissance correspondants, normalisés à leur valeur maximale. Le pic se décale vers la gauche lorsque la raideur du piège décroît : le maximum du spectre est à $0,95 \text{ Hz}$ à $0,175 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$, $0,8 \text{ Hz}$ à $0,04 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$, et $0,75 \text{ Hz}$ à $0,013 \text{ pN}\cdot\text{nm}^{-1}$.

(c), (d) : Dépendance de l'amplitude et de la fréquence avec la raideur du piège sur l'ensemble de nos données ($n = 13$)

certaines cas, comme celui illustré Fig. III.37, le mouvement de la bille ne se résume pas à une rotation à vitesse constante, produisant sur les deux voies de la diode des oscillations sinusoïdales. Bien que toujours circulaire (Fig. III.37(b)), le mouvement peut s'effectuer en plusieurs phases de vitesses différentes. Cela se traduit dans les signaux mesurés par une anharmonicité produisant une forme d'oscillation triangulaire (Fig. III.37(a)).

2 Interprétation

Nous avons dans les sections précédentes de ce chapitre décrit et discuté des observations effectuées dans une configuration où des moteurs tirent sur un filament, soumis à une force élastique s'opposant à la force exercée par les moteurs. Si le filament est considéré comme infiniment rigide, le schéma mécanique équivalent du

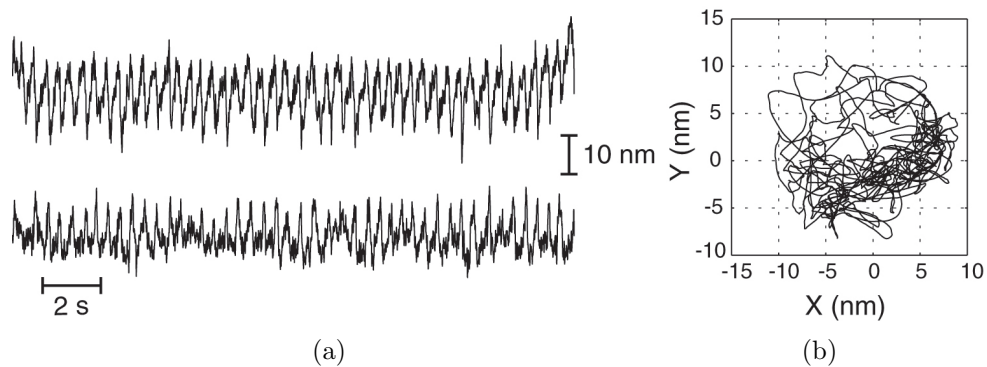


FIG. III.37: **Rotation anharmonique de la bille**

(a) Déplacement de la bille selon les deux axes de la photodiode. Signaux obtenus après une moyenne glissante sur 10 ms. Les deux signaux présentent une oscillation triangulaire à 2,5 Hz avec une amplitude de 20 nm.

(b) Trajectoire de la bille dans le plan XY : le mouvement est circulaire, mais la bille passe plus de temps dans la partie inférieure de la trajectoire, ce qui indique que cette phase est plus lente.

système est le même quelle que soit la position de la bille sur le filament. En pratique, le filament d'actine a une rigidité finie ; si la bille est située à proximité du bout pointu du filament, les moteurs vont pousser sur le filament et la bille, au lieu de les tirer comme indiqué figure III.1. Sous l'effet des forces opposées exercées par les moteurs et le piège, il peut survenir une instabilité de flambage du filament d'actine.

Ce phénomène se produit fréquemment en test de motilité *in vitro*, et a été étudié en détail expérimentalement et théoriquement (Bourdieu et coll., 1995a; Sekimoto et coll., 1995). Le mouvement des filaments le long de la surface recouverte de moteurs peut être interrompu par un défaut ponctuel, qu'il s'agisse d'un point d'adhésion du filament à la surface, ou d'une tête de myosine défectueuse. Sous l'effet de la force produite par les myosines, le filament adopte alors une forme de spirale et effectue un mouvement de rotation autour du point d'attachement (Fig. III.38(a)). Le rayon du cercle limite dessiné par le filament est de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$, et la fréquence de rotation vaut typiquement 0,5 Hz, ce qui correspond aux fréquences de rotation de billes que nous mesurons.

Il est possible de décrire ce phénomène, malgré le petit nombre de moteurs mis en jeu, par un modèle élastique continu (Bourdieu et coll., 1995a). Dans cet article, la force produite localement par chaque moteur sur le filament est remplacée par une force constante par unité de longueur tout le long du filament. Les autres forces sont la tension du filament, la friction visqueuse, une force de rappel due à la rigidité de courbure du filament, et une force aléatoire représentant les fluctuations thermiques. Le point d'attachement est modélisé à l'une des extrémités par un puits de potentiel harmonique de grande raideur. Avec ces hypothèses, des simulations numériques reproduisent fidèlement le mouvement de rotation du filament (Fig. III.38(b)). Ce modèle permet également, à partir de la mesure du rayon du cercle formé par l'ex-

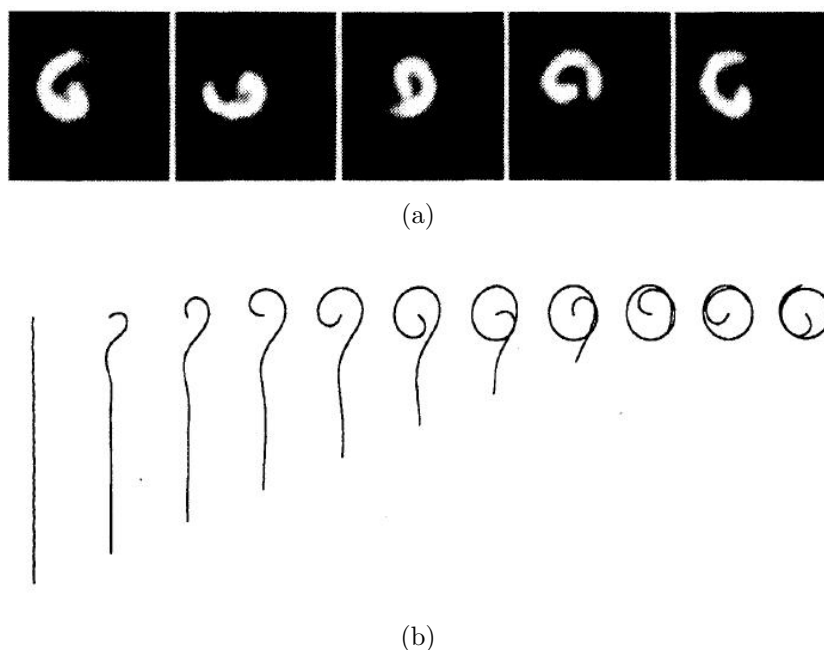


FIG. III.38: **Effet d'un défaut de surface sur la motilité in vitro**

(a) Séquence d'images d'un filament d'actine effectuant une rotation en spirale autour d'un défaut ponctuel. L'intervalle entre les images est de 0,3 s.

(b) Simulation numérique du comportement du filament décrit par une approximation de milieu continu. Extrait de (Bourdieu et coll., 1995a)

trémité libre du filament au cours de la rotation, d'estimer la force produite par un moteur individuel à hauteur de 0,5 – 0,7 pN.

Il est intéressant de remarquer que dans ces simulations, le point d'ancrage du filament à la surface est modélisé par un potentiel harmonique fort. C'est exactement la situation que matérialise notre configuration expérimentale, où le piège optique se comporte comme un puits de potentiel harmonique. Nos observations apportent l'information supplémentaire que la vitesse de rotation du filament décroît avec la raideur du potentiel. Il serait intéressant de voir si la modélisation utilisée pour étudier les défauts en test de motilité permet de comprendre cette dépendance.

Chapitre IV

Expériences à l'échelle de la molécule unique : un rôle du filament d'actine ?

OUTRE les expériences sur le comportement collectif des HMM qui font l'objet du chapitre précédent, nous avons également effectué des mesures d'accrochages HMM-actine, à l'échelle de la molécule unique, en utilisant le même appareillage. Ces expériences utilisent la géométrie à trois billes que nous avons mentionnée au premier chapitre, très utilisée pour les expériences de molécule unique sur les moteurs non processifs. La myosine II musculaire, ainsi que ses sous-fragments (S1 et HMM) ont été étudiées de manière approfondie en molécule unique, afin de mesurer diverses caractéristiques du cycle mécanique du moteur : taille du changement conformationnel associé au coup de force¹, force produite, raideur d'accrochage, taux de transition entre les différentes étapes du cycle... La grande majorité des travaux publiés concernent la mesure de caractéristiques intrinsèques du moteur, indépendamment du filament d'actine, qui n'est supposé jouer qu'un rôle passif de "piste" sur laquelle le moteur peut s'accrocher et avancer. Il n'est envisagé que très rarement que l'actine puisse intervenir dans les propriétés de mouvement et de génération de force du moteur. Dans ce chapitre, nous présentons des résultats préliminaires issus d'expériences où nous étudions la raideur de l'accrochage actine-myosine en fonction de la tension permanente dans le filament d'actine.

A Données brutes et mesure du pas des HMM

Nous utilisons une configuration classique "à trois billes" : une grosse bille (de $2,3 \mu\text{m}$ de diamètre) sert de piédestal sur lequel est accroché un moteur, et un filament d'actine, tendu entre deux billes (de $1 \mu\text{m}$ de diamètre) tenues par deux pièges optiques, est amené à proximité du moteur jusqu'à ce que des accrochages soient détectés (le protocole est détaillé au chapitre II). Le filament est mis sous

¹Afin de ne pas alourdir le discours, et à défaut d'une traduction satisfaisante, nous utiliserons dans la suite l'anglicisme "working stroke" pour désigner cette grandeur.

tension en maintenant un piège fixe et en éloignant le deuxième. La tension dans le filament est calculée à partir du déplacement de la bille dans le piège fixe.

Lorsqu'on enregistre simultanément le mouvement des deux billes accrochées aux extrémités du filament, chaque bille étant tenue dans un piège de faible raideur ($0,03 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$), on obtient des signaux dont la Fig. IV.1 fournit un exemple caractéristique.

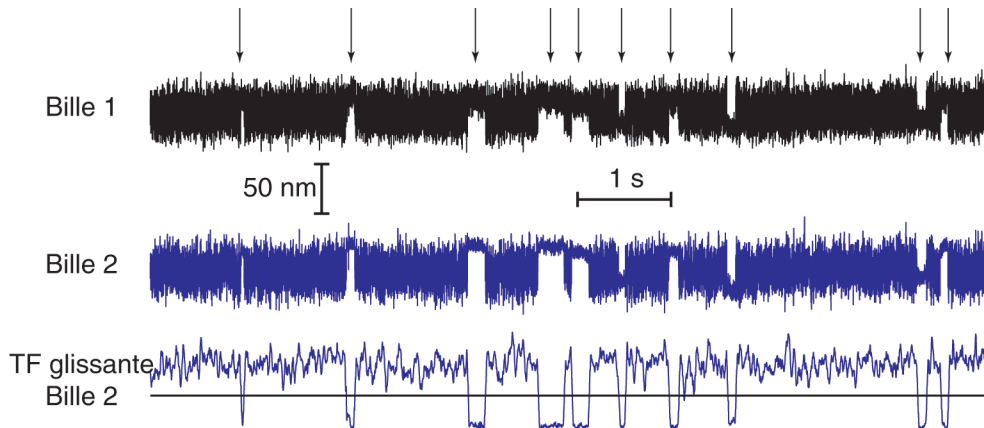


FIG. IV.1: **Signaux enregistrés pendant une expérience de molécule unique**

Les deux signaux supérieurs correspondent au déplacement des deux billes fixées au filament. Lorsque le moteur s'accroche à l'actine, les fluctuations des deux signaux décroissent fortement en amplitude (événements indiqués par des flèches noires). Le signal inférieur est la transformée de Fourier glissante à 150 Hz du signal de la bille 2. Les accrochages sont détectés automatiquement lorsque ce signal devient inférieur à un seuil fixé manuellement (ligne noire).

Afin de faciliter la détection des accrochages lors de l'analyse de données, on impose à l'un des deux pièges une modulation sinusoïdale à une fréquence de 150 Hz d'amplitude 80 nm (Veigel et coll., 1998). La bille correspondante ("Bille 1") se déplace donc à la même fréquence, avec une amplitude déterminée par les différentes raideurs en série dans le système. La mesure de la transmission de cette modulation à l'autre bille ("Bille 2"), elle aussi fonction des raideurs présentes dans la structure, permet de détecter plus efficacement les accrochages qu'en utilisant simplement les variations d'amplitude des fluctuations de l'une ou l'autre des billes. En pratique la transmission de la modulation à la bille 2 est mesurée en calculant au cours de l'analyse des données la transformée de Fourier discrète à 150 Hz du déplacement de la bille 2 sur une fenêtre glissante. Plus la fenêtre glissante est large, moins la transformée de Fourier discrète est bruitée et donc plus la détection est aisée. En contrepartie, plus la fenêtre est large plus le délai est grand entre le début d'un événement et sa détection. Pour les mesures que nous effectuons, les tous premiers instants des accrochages ne sont pas particulièrement importants. Nous avons donc choisi de prendre une fenêtre large de deux périodes, c'est-à-dire environ 13 ms. Dans ces conditions, on peut estimer à l'oeil que l'accrochage est détecté en général environ une période après son début effectif. Il peut arriver que de faux accrochages

subsistent et soient détectés, correspondant à des chutes abruptes et brèves de la transformée de Fourier discrète. La durée des accrochages couvrant typiquement une gamme de 60 à 800 ms (Fig. IV.2(b)), afin d'éliminer ces artefacts, tous les accrochages de durée inférieure à 40 ms sont systématiquement supprimés des données.

La plupart du temps, le moteur est décroché et on n'observe que les fluctuations thermiques de l'assemblée bille-actine-bille, auxquelles est superposé l'effet de la modulation du piège 1. Avec une distribution temporelle apparemment aléatoire, on observe des segments du signal de position pour lesquels l'amplitude des fluctuations est réduite. L'interprétation classique de ces événements est qu'ils correspondent à l'accrochage d'un moteur unique à l'actine. La durée des accrochages est stochastique, mais il a été montré qu'en moyenne les événements sont d'autant plus longs que la concentration en ATP est faible, ce qui est cohérent avec le fait que le détachement est catalysé par la liaison d'une molécule d'ATP au moteur. C'est la raison pour laquelle les expériences de molécule unique sont effectuées à très faible concentration en ATP (1 μM dans notre cas, comparé à 2 mM pour les expériences sur le comportement collectif des moteurs).

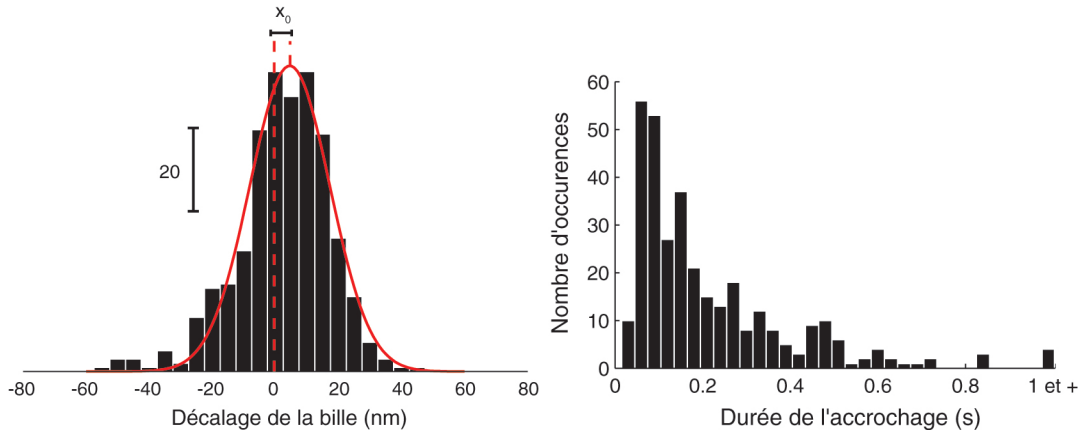


FIG. IV.2: Mesure du “working stroke” d’une molécule de HMM et durées des accrochages

(a) Distribution des décalages par rapport à la valeur moyenne de la bille 2 lors de 485 accrochages mesurés sur 4 molécules différentes. En rouge est illustré le meilleur ajustement d’une fonction gaussienne $Ae^{-\left(\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}\right)}$, obtenu avec $x_0 = 4,5 \pm 1,1$ nm et $\sigma = 12,7 \pm 1,5$ nm. La raideur du piège k_T vaut environ 0,03 pNnm. Les fluctuations browniennes correspondantes d’une bille piégée ont une variance $\langle x^2 \rangle$ donnée par $\langle x^2 \rangle = k_B T / k_T$. On obtient $\sqrt{\langle x^2 \rangle} \simeq 11,7$ nm, en bon accord avec la valeur de σ obtenue. (b) Distribution de la durée des accrochages. La durée la plus fréquente est d’environ 90 ms, et la durée moyenne vaut 220 ms.

Chaque accrochage s’accompagne d’un décalage de la position moyenne de la bille par rapport à sa position moyenne lorsque le moteur est décroché. Ce décalage, attribué à un changement conformationnel du moteur, n’est pas identique d’un événement à l’autre. On observe une distribution stochastique des décalages; cette distribution est bien décrite par une gaussienne dont la variance est proche de celle du mouvement brownien d’une bille piégée ($\langle x^2 \rangle = k_B T / k_T$). Cela suggère que les

fluctuations dans la mesure du changement conformationnel sont dues au mouvement brownien de la bille (Molloy et coll., 1995a). Le pic de la gaussienne est décalé par rapport à 0, ce qui indique que le moteur produit en moyenne un déplacement. Numériquement, nous obtenons un déplacement $d = 4,5 \pm 1,1$ nm pour les HMM que nous utilisons (Fig.IV.2(a)). En raison de l'existence d'un lien série de raideur finie entre la bille (Bille 2 sur la fig. IV.3) dont on mesure la position et le moteur, cette valeur du déplacement est une sous-estimation du déplacement moyen réellement induit par le moteur. L'équilibre des forces appliqué à la bille indique que $d_m = (1 + k_{T,2}/k_{L,2})d$. A une tension d'actine typique de 2 pN, $k_{L,2} \simeq 0,1$ pN · nm⁻¹, ce qui donne $d_m = 5,8 \pm 1,4$ nm. Cette valeur est en bon accord avec les valeurs publiées pour des HMM ou des sous-fragments S1 (Veigel et coll., 1998; Molloy et coll., 1995a; Kitamura et coll., 1999).

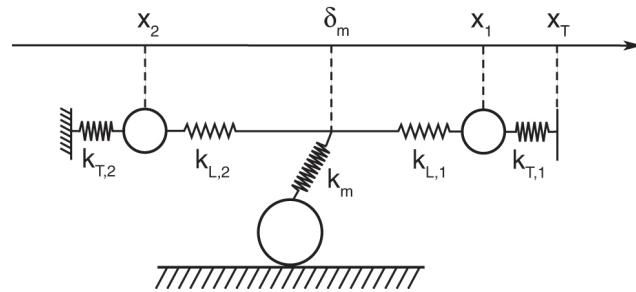


FIG. IV.3: **Modèle mécanique équivalent au système à trois billes avec un moteur attaché au filament**

Le piège sujet à une modulation sinusoïdale d'amplitude constante est à droite. Le piège fixe est à gauche. Les grandeurs x_i représentent les amplitudes des composantes oscillant à la fréquence de la modulation des déplacements des points considérés. Le pont actine-myosine, pendant l'accrochage du moteur, est caractérisé par une raideur k_m à déterminer.

B Mesure de la raideur du lien actine-myosine

A partir de l'amplitude du mouvement fluctuant des deux billes accrochées à l'actine, il est possible de mesurer pour chaque accrochage la raideur du "pont" actine-myosine formé. Pour cela, on extrait l'amplitude (en nanomètres) des composantes de Fourier à la fréquence d'excitation du déplacement du piège, de la bille 1 et de la bille 2 pendant l'accrochage considéré. Il faut à partir de ces valeurs calculer l'amplitude f_m de la force oscillante appliquée au pont, ainsi que son extension correspondante δ_m . Le rapport f_m/δ_m donne la raideur du pont, k_m .

La fréquence de coupure du spectre de puissance des fluctuations d'une bille piégée dans un piège de raideur $0,03$ pN · nm⁻¹ vaut typiquement 500 Hz. La friction visqueuse ne joue donc aucune rôle tant qu'on stimule à des fréquences inférieures à cette valeur. Pour une fréquence d'excitation de 150 Hz, l'équation du mouvement de chacune des billes se ramène donc à l'équilibre des forces élastiques qui lui sont

appliquées :

$$k_{T,1}(x_T - x_1) = k_{L,1}(x_1 - \delta_m) \quad (\text{IV.1})$$

$$k_{T,2}x_2 = k_{L,2}(\delta_m - x_2) \quad (\text{IV.2})$$

On ne dispose que de deux équations pour trois inconnues : δ_m , $k_{L,1}$, et $k_{L,2}$. Il faut donc faire une hypothèse supplémentaire pour pouvoir résoudre ce système. Une possibilité est de postuler pour simplifier que $k_{L,1} = k_{L,2} = k_L$ (Veigel et coll., 1998), dans la mesure où les deux liens bille-actine sont de même nature, et que l'accrochage du moteur a lieu approximativement au milieu du filament d'actine. Nous suivons dans la suite du raisonnement cette hypothèse. On peut alors, en effectuant le rapport des deux équations ci-dessus, éliminer k_L du système et, en posant $\alpha = k_{T,2}/k_{T,1}$, on obtient δ_m en fonction uniquement de grandeurs mesurées :

$$\delta_m = \frac{x_2x_T + (\alpha - 1)x_1x_2}{\alpha x_2 + x_T - x_1}. \quad (\text{IV.3})$$

La force sur le pont se calcule par :

$$f_m = k_{T,1}(x_T - x_1) - k_{T,2}x_2. \quad (\text{IV.4})$$

Remarquons qu'avec l'hypothèse $k_{L,1} = k_{L,2}$, la mesure de k_m ne dépend pas de la raideur des liens séries. On peut également mesurer k_L pendant l'accrochage avec l'une ou l'autre des équations de départ.

Nous avons mesuré la raideur du pont actine-HMM de cette manière sur deux molécules différentes (et deux filaments d'actine différents), en faisant varier la tension imposée au filament d'actine avant de l'amener au contact du moteur. La première molécule (molécule 1) a fait l'objet de mesures avec des tensions de 1,5 pN et 2,7 pN. La deuxième (molécule 2) avec des tensions de 2,2 pN et 4,2 pN. Pour avoir des résultats statistiquement significatifs, il est préférable d'enregistrer un grand nombre d'événements d'accrochage pour chaque valeur de tension, ce qui implique des durées d'expérience assez longues. La durée de vie des filaments d'actine est limitée, c'est pourquoi nous n'avons pas jusqu'à présent testé plus de deux valeurs différentes de tension sur un même système. Nous avons collecté pour chaque valeur de tension un nombre N d'accrochages et mesuré pour chacun d'eux la valeur de la raideur du pont. Les données ainsi obtenues sont naturellement distribuées avec une variance σ . Nous mesurons ensuite la valeur moyenne de la raideur du pont sur l'ensemble des accrochages pour une même tension, et l'incertitude sur cette valeur moyenne vaut σ/\sqrt{N} .

Nous avons observé que la raideur moyenne du lien formé par une molécule de HMM à l'actine augmente lorsque la tension imposée au filament augmente (Fig. IV.4(a)). Aux faibles tensions, la raideur vaut environ $0,4 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$, ce qui est compatible avec la valeur précédemment obtenue de $0,69 \pm 0,47 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ dans des conditions similaires (Veigel et coll., 1998). La raideur augmente pour atteindre $1,3 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ à $4,2 \text{ pN}$ de tension. Le tracé de la distribution des valeurs mesurées pour les deux points extrêmes de tension (Fig. IV.4(b)) montre que les valeurs sont plus largement distribuées lorsque la tension est forte. Mais la tendance à un décalage vers de plus fortes raideurs est nette. Des valeurs de raideurs supérieures à $1 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ se produisent également beaucoup plus souvent, et quelques valeurs atteignent plus de $3,5 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$.

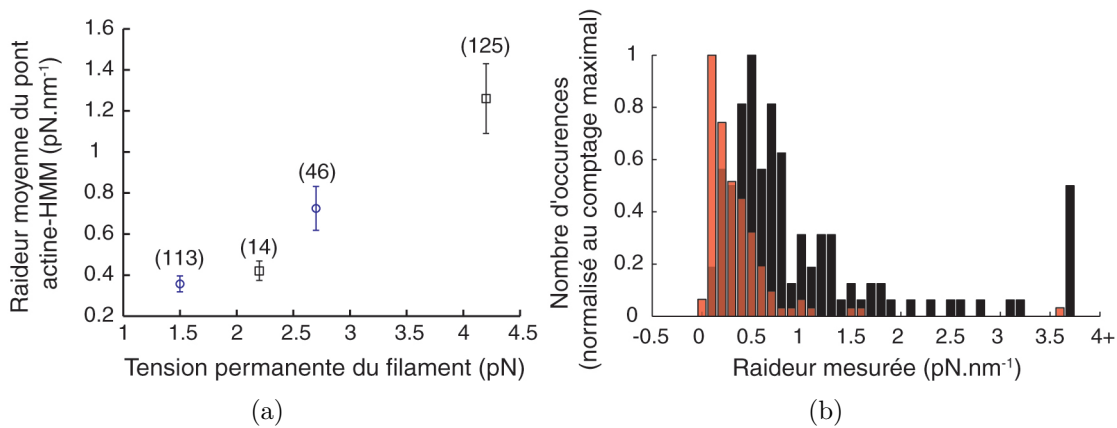


FIG. IV.4: Mesures de la raideur du lien actine-HMM

(a) Evolution de la raideur du lien avec la tension dans le filament d'actine. Les données obtenues avec la molécule 1 (ronds bleus) et la molécule 2 (carrés noirs) sont regroupées sur le même graphe. Au-dessus de chaque point le nombre d'accrochages utilisés pour la mesure est indiqué. Sur l'ensemble des points, aussi bien que pour les données issues d'un même système, la raideur moyenne augmente avec la tension dans le filament. Cependant, les deux points extrêmes, pour lesquels le plus d'événements ont été obtenus, ne correspondent pas à la même molécule ni au même filament.

(b) Histogrammes normalisés des raideurs mesurées à $1,5 \text{ pN}$ (rouge) et $4,2 \text{ pN}$ (noir). Les valeurs sont distribuées plus largement à $4,2 \text{ pN}$, mais le maximum de l'histogramme est nettement décalé vers la droite par rapport à $1,5 \text{ pN}$.

La figure IV.5 montre les raideurs moyennes des liens séries en fonction de la tension, pendant les accrochages et hors accrochages. Lorsque la mesure est effectuée hors accrochage (Fig. IV.5(a)), on mesure directement la combinaison en série de $k_{L,1}$ et $k_{L,2}$. La mesure pendant les accrochages donne la valeur de la raideur d'un seul des deux liens ; mais cette mesure est évidemment dépendante de l'hypothèse de départ $k_{L,1} = k_{L,2}$ (Fig. IV.5(b)). A l'exception du deuxième point, dans les deux cas la raideur du lien augmente lorsqu'on augmente la tension. Si on considère un système filament d'actine-HMM donné, la raideur augmente systématiquement avec la tension, que ce soit pendant que le moteur est accroché ou hors événements d'accrochage. Cette observation est cohérente avec les mesures de raideur d'un assemblage

bille-actine-bille avec des lien myosine-NEM en fonction de la force présentées au chapitre II (Fig. p. 101), qui montrent que ces liens sont non linéaires et présentent une raideur qui croît avec la tension.

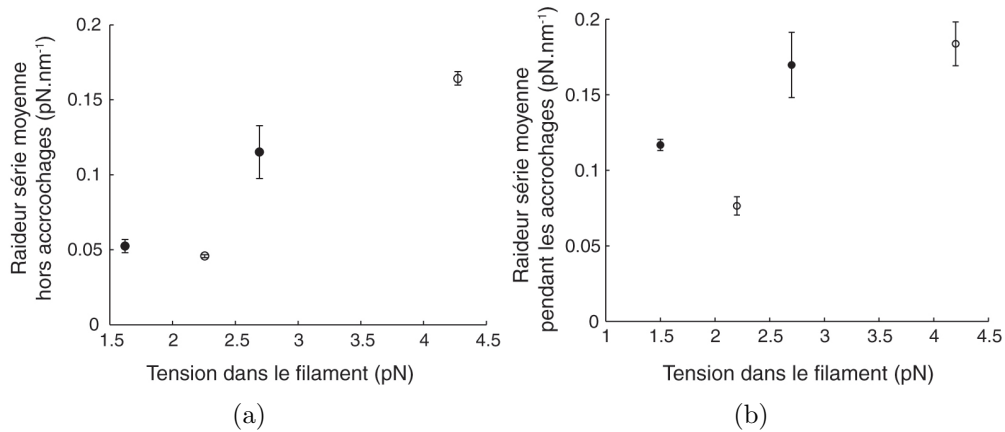


FIG. IV.5: **Mesures des raideurs en séries dans le système**
 Les symboles identiques concernent un même filament d'actine donné.
 (a) Mesure hors des périodes d'accrochage
 (b) Mesure pendant les accrochages

C Interprétation et discussion des résultats

1 Validité de l'analyse des données

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'analyse des données brutes pour le calcul de la raideur du lien HMM-actine est compliquée par la présence de liens de raideur finie en série entre les billes et le moteur étudié. Nous les avons prises en compte dans l'analyse, mais avons été amenés à faire une hypothèse dont nous allons maintenant discuter. L'augmentation de la raideur du pont actine-myosine avec la tension est-elle un vrai effet lié aux propriétés du moteur et de l'actine, ou est-elle un artefact lié aux liens série ou à l'hypothèse $k_{L,1} = k_{L,2}$ que nous avons utilisée dans notre analyse ?

Pour répondre à cette question, trois points sont à considérer :

1. Hors de toute hypothèse, l'équation IV.2 donne :

$$\delta_m = \left(\frac{k_{T,2} + k_{L,2}}{k_{L,2}} \right) x_2. \quad (\text{IV.5})$$

x_2 est une grandeur mesurée : on peut donc observer comment elle varie avec la tension du filament (Fig. IV.6(b)). En moyenne il apparaît clairement que x_2 est plus faible à 4,2 pN de tension qu'à 1,5 pN. Par ailleurs, d'une valeur de tension à l'autre, la raideur du piège ne varie pas, donc si $k_{L,2}$ augmente,

comme semblent l'indiquer les observations présentées dans la section précédente, $\frac{k_{T,2}+k_{L,2}}{k_{L,2}}$ diminue ². En conséquence, δ_m diminue dans nos expériences quand la tension augmente.

2. $k_m = f_m/\delta_m$. Si on suppose que k_m reste constante quand la tension dans le filament d'actine augmente, si δ_m diminue, f_m doit nécessairement diminuer aussi.
3. $f_m = k_{T,1}(x_T - x_1) - k_{T,2}x_2$. Tout comme x_2 , on peut étudier la variation des distributions des valeurs mesurées de x_1 à forte et faible tension de filament (Fig. IV.6(a)). De même que x_2 , x_1 est en moyenne plus faible à 4,2 pN qu'à 1,5 pN. x_T est constant dans toutes les expériences. Si x_1 et x_2 diminuent, f_m augmente donc. C'est bien ce qu'on observe figure IV.6(c).

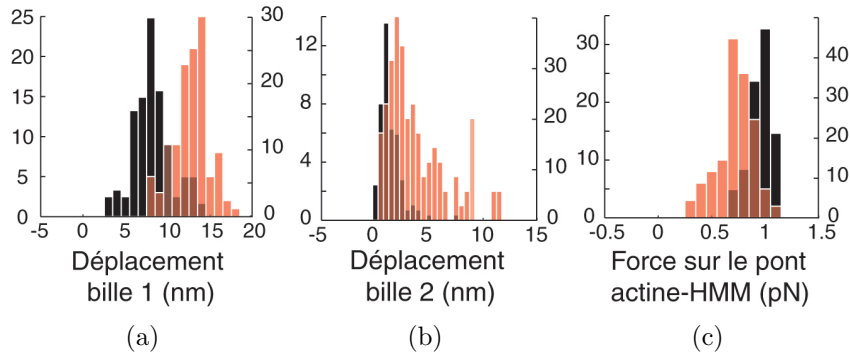


FIG. IV.6: **Comparaison des distributions des grandeurs mesurées à haute et basse tension**

Les histogrammes rouges (axes des ordonnées à gauche) correspondent aux données obtenues à 1,5 pN et les noirs (axes des ordonnées à droite) à 4,2 pN.

(a) Déplacement de la bille 1 : le déplacement moyen est plus grand à basse tension (12,7 nm) qu'à haute tension (8,2 nm).

(b) Déplacement de la bille 2 : le déplacement moyen est également plus grand à basse tension (3,9 nm) qu'à haute tension (1,4 nm).

(c) Force appliquée au pont : en moyenne le pont subit une force plus importante à forte tension (0,95 pN) qu'à faible tension (0,73 pN).

Les conclusions des points 2 et 3 sont évidemment en contradiction. Ce raisonnement qualitatif montre que, même sans hypothèse préalable, on peut conclure que la raideur du pont actine-myosine augmente lorsque la tension dans le filament augmente. Un point du raisonnement reste cependant potentiellement contestable. Au point 1, nous mentionnons que $k_{L,2}$ augmente avec la tension. Or les mesures de lien série hors accrochages, qui ne reposent sur aucune hypothèse, indiquent uniquement que la combinaison en série de $k_{L,1}$ et $k_{L,2}$ augmente. Si $k_{L,1}$ est le ressort limitant dans la combinaison, c'est-à-dire si $k_{L,1}$ est notablement plus faible que $k_{L,2}$, ce dernier peut diminuer quand la tension dans le filament augmente, et la raideur totale augmenter tout de même si $k_{L,1}$ augmente suffisamment. Une nouvelle fois, le problème vient du fait qu'on ne peut connaître séparément $k_{L,1}$ et $k_{L,2}$. Néanmoins, les deux liens

²En effet, la fonction $(1+u)/u$ est décroissante pour tout $u > 0$

sont de même nature, et il est peu probable que l'un soit beaucoup plus faible que l'autre, et qu'ils aient deux comportements opposés vis-à-vis d'une augmentation de la tension σ dans le filament. En particulier, si le filament d'actine lui-même est responsable pour une part importante de la raideur série, on s'attend à ce que la raideur croisse comme $\sigma^{3/2}$ (cf annexe p. 194).

La conclusion qualitative que la raideur du pont actine-myosine augmente avec la tension imposée au filament d'actine ne dépend donc pas de l'hypothèse $k_{L,1} = k_{L,2}$ qui a présidé à notre analyse de données, tant que $k_{L,1}$ et $k_{L,2}$ sont des fonctions croissantes de la tension appliquée à l'actine. Dans le cas où $\beta = k_{L,2}/k_{L,1}$ est différent de 1, on pourrait calculer δ_m de la même manière qu'exposé plus haut, et obtenir

$$\delta_m = \frac{x_2 x_T + \left(\frac{\alpha}{\beta} - 1\right) x_1 x_2}{\frac{\alpha}{\beta} x_2 + x_T - x_1}. \quad (\text{IV.6})$$

Avec l'équation IV.4 donnant f_m , qui est inchangée, cela conduirait à des corrections sur les valeurs numériques de k_m que nous avons estimées.

2 Raideurs du lien actomyosine *in vitro* et dans les muscles

La raideur du lien formé par l'accrochage d'une myosine au filament d'actine est une grandeur au sujet de laquelle un désaccord important persiste entre les valeurs issues de mesures effectuées *in vitro* à l'échelle de la molécule unique et les valeurs déduites de mesures sur des fibres musculaires entières, mettant en jeu un grand nombre de moteurs.

Comme nous l'avons vu au chapitre I, la raideur d'un lien actine-myosine II est estimée dans les muscles à environ 2 à 5 pN · nm⁻¹ (Howard, 2001; Huxley et Tideswell, 1996). D'un autre côté, de nombreuses études *in vitro* ont été menées par différents groupes pour mesurer la raideur du lien actine-myosine II, en utilisant différents instruments, (pinces optiques en géométrie à trois billes, microaiguilles flexibles attachées à un filament d'actine), différents types d'accrochage bille-actine (myosines NEM, biotine-streptavidine, gelsoline), et différentes formes du moteur (myosine entière, myosines polymérisées en filament, HMM, fragments S1). Les valeurs données par ces différents travaux sont récapitulées dans le tableau IV.1.

A l'exception de la dernière étude mentionnée, tous ces travaux utilisent des systèmes de mesure de force (pince optique ou microaiguilles) de faible raideur, ce qui implique que les moteurs sont soumis à une faible charge. En dépit de leur dispersion, qui peut s'expliquer par la diversité des conditions expérimentales, toutes les valeurs de raideur sont notablement inférieures aux valeurs estimées à partir des expériences sur les fibres musculaires. La mesure effectuée par (Ishijima et coll., 1996), où les myosines sont polymérisées en filaments épais et donc correctement orientées vis-à-vis du filament d'actine, ne fournit pas une valeur plus élevée que les autres expériences. L'utilisation d'un lien gelsoline (Nishizaka et coll., 2000) est supposée diminuer le problème de la raideur série parasite car dans ce cas l'accrochage se fait à l'extrémité du filament d'actine. Mais là encore la raideur mesurée n'est pas notablement différente de celles obtenues par les autres groupes. Dans toutes ces

Auteurs	Forme de moteur utilisée	Type d'accrochage	Raideur moyenne mesurée ($\text{pN} \cdot \text{nm}^{-1}$)
(Veigel et coll., 1998)	HMM	Myo-NEM	$0,7 \pm 0,47$
(Mehta et coll., 1997)	HMM	HMM-NEM	$0,65 \pm 0,18$
(Molloy et coll., 1995a)	S1	Myo-NEM	0,48
(Nishizaka et coll., 2000)	HMM (rigor)	gelsoline	$0,58 \pm 0,26$
(Ishijima et coll., 1996)	filaments épais	Myo-NEM	0,28
(Takagi et coll., 2006)	myosines entières	biot.-strept.	$1,3 \pm 0,02$

TAB. IV.1: Tableau récapitulatif des raideurs de lien actine-myosine obtenues par différents groupes

expériences, la tension imposée au filament d'actine avant de le faire interagir avec une myosine est relativement faible (2-3 pN). Dans ces conditions, nous mesurons également une raideur du lien actine-myosine $k_m \simeq 0,35 - 0,8 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$. Nous avons cependant remarqué que cette valeur peut augmenter jusqu'à $1,25 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ lorsque la tension du filament est augmentée à 4,5 pN. Remarquons qu'une étude utilisant une tension (plus élevée que les autres expériences de molécule unique) de 5 pN donne également une valeur de raideur moyenne de $1,3 \text{ pN} \cdot \text{nm}^{-1}$ (Takagi et coll., 2006). Il est tentant de spéculer que les différences observées entre les valeurs obtenues à partir des fibres musculaires et en molécule unique pourraient provenir du fait que les filaments fins, dans les muscles, sont soumis à des tensions beaucoup plus importantes (jusqu'à 200 pN en activation complète) que dans les expériences *in vitro*.

Cette proposition soulève toutefois un point d'inquiétude qui mérite d'être souligné. Dans nos expériences *in vitro*, ainsi que dans toutes celles des auteurs précédemment cités, nous travaillons à très faible concentration d'ATP. Par conséquent, le décrochage induit par l'ATP est l'étape limitante du cycle de la myosine, et nous avons donc probablement sondé l'élasticité du lien actine-myosine lorsque la myosine est dans l'état *rigor*, sans nucléotide. Cette situation contraste avec celle des muscles, dans lesquels l'ATP est à concentration saturante. Dans ce cas, les myosines liées à l'actine sont probablement aussi liées à un nucléotide. La comparaison de la raideur mesurée en molécule unique et dans les fibres musculaires n'est fondée qu'avec l'hypothèse implicite que le lien actine myosine se comporte comme un élément élastique linéaire de raideur indépendante de l'état chimique de la myosine. Si la raideur dépendait de l'état biochimique du moteur, il faudrait alors reconsidérer la comparaison fibres musculaires-molécule unique.

3 Un rôle non-spectateur du filament d'actine

En plus de servir de support à leur mouvement, le filament d'actine catalyse l'activité ATPasique des myosines. A ce titre il est un agent indispensable du mécanisme de production de force par le moteur. Cependant, la plupart des études

et des modèles se sont focalisés uniquement sur le moteur lui-même, supposé agir comme un générateur de force indépendant. Le modèle du “swinging crossbridge” en est une excellente illustration : dans ce modèle, le filament d’actine est purement spectateur : il offre une piste avec des sites d’accrochages régulièrement espacés, et catalyse le changement conformationnel du moteur donnant lieu à la conversion d’énergie chimique en énergie mécanique.

Plusieurs expériences suggèrent que l’accrochage des moteurs entraîne des modifications de la structure du filament d’actine. Lors de la contraction musculaire, des mesures de diffraction de rayons X ont permis d’observer une augmentation de l’espacement entre les monomères d’actine au sein du filament de 0,2 à 0,3% (Wakabayashi et coll., 1994; Huxley et coll., 1994). Des expériences *in vitro* ont également montré que l’interaction de moteurs avec un filament d’actine entraîne une torsion de ce dernier (Nishizaka et coll., 1993; Sase et coll., 1997). Enfin, des mesures de fluorescence par transfert résonant d’énergie (FRET) ont récemment montré que les monomères d’actine peuvent exister sous deux états, “faible FRET”, et “fort FRET”, correspondant à des conformations différentes des monomères, et que l’accrochage de myosines déplace l’équilibre en faveur de l’état “fort FRET” (Kozuka et coll., 2006). Si tous ces résultats indiquent un effet dû à l’accrochage des moteurs sur la structure de l’actine, il n’existe pas en revanche de preuve directe d’un mécanisme inverse où une modification des propriétés de l’actine entraînerait un changement du comportement des moteurs. Les résultats que nous présentons dans ce chapitre, s’ils sont confirmés, constitueraient ainsi un premier pas dans ce sens. En particulier, on pourrait envisager l’existence au niveau moléculaire de mécanismes coopératifs entre différents moteurs médiés par le filament d’actine, l’accrochage de certains moteurs modifiant localement les propriétés du filament, en le mettant sous tension, ces modifications se répercutant ensuite sur les propriétés de moteurs nouvellement accrochés.

Dans une perspective plus lointaine, l’observation d’une influence de la tension dans le filament d’actine sur les propriétés du moteur pourrait également éclairer d’un jour nouveau le phénomène d’activation des fibres musculaires par étirement (Pringle, 1978), dont l’origine reste obscure. Mesurer la raideur du pont actine-myosine n’est pas mesurer la force produite par le moteur. Pour montrer que la force produite peut être plus importante lorsque la tension dans le filament d’actine augmente, il faudrait s’assurer que le déplacement produit par la myosine pendant qu’elle effectue son coup de force reste constant quand la tension dans le filament augmente. Le nombre d’accrochages que nous avons accumulés pour différentes valeurs de tension est trop faible pour nous permettre de mesurer pour chaque valeur de tension le “working stroke” de la myosine par la méthode de l’ajustement gaussien que nous avons exposée plus haut. Nous ne pouvons donc trancher sur ce point. Mais une telle observation fournirait une explication naturelle à l’activation des fibres musculaires par leur étirement, par un mécanisme intrinsèque au système contractile sans qu’il soit nécessaire d’invoquer le recrutement d’un nombre de moteurs plus important par une diminution de l’espacement entre les filaments fins et les filaments épais lorsque la fibre est étirée (Ishiwata et coll., 2007).

D Conclusion

Les expériences que nous avons effectuées suggèrent qu'une molécule unique de myosine II interagit avec un filament d'actine en formant un lien d'autant plus rigide que la tension préexistante dans le filament est importante. Il s'agirait d'une manifestation évidente d'un rôle bien plus important qu'admis communément du filament d'actine dans la génération de force par le système acto-myosine. Les perspectives ouvertes par l'existence d'un tel phénomène sont vastes et alléchantes. Il paraît d'autant plus indispensable de confirmer ces résultats préliminaires, afin de leur donner plus de consistance statistique. La source principale d'incertitude quant à la véracité de nos résultats provient de l'existence de liens élastiques parasites en série entre le moteur étudié et notre système de mesure. La répétition de ces expériences en changeant la nature de ces liens, par exemple en utilisant une liaison biotine-streptavidine entre les billes et l'actine au lieu de myosines-NEM, si elle permet de reproduire ces résultats, renforcerait la crédibilité du phénomène présenté ici. Dans la mesure où les liens biotine-streptavidine sont plus résistants aux fortes tensions que les liens myosines-NEM, il serait éventuellement possible d'effectuer des mesures mettant en jeu des valeurs encore plus importantes de la tension dans le filament. Ces quelques pistes rapidement lancées ne doivent cependant pas conduire à sous-estimer le travail qu'elles impliquent : comme toutes les études à l'échelle de la molécule unique, ces expériences sont délicates et difficiles. Dans la configuration à trois billes, en particulier, l'assemblage bille-filament-bille mis sous tension est délicat à construire et constitue un édifice fragile dont la rupture met souvent fin à l'expérience. Explorer des valeurs élevées de tension rend évidemment ce problème d'autant plus sensible.

Conclusion générale et perspectives

L'essentiel des travaux expérimentaux que nous avons effectués et exposés dans ce manuscrit concernent les propriétés dynamiques d'une assemblée de moteurs moléculaires non processifs, des myosines II, en interaction avec un filament d'actine unique. Lorsqu'un tel système est soumis à une force de rappel élastique, nous avons observé qu'il peut produire des oscillations mécaniques spontanées, qui sont parfois analogues en forme et en fréquence aux oscillations spontanées de contraction observées dans les fibres musculaires, ou aux oscillations spontanées des touffes ciliaires des cellules ciliées mécanosensibles responsables de l'audition et de l'équilibre chez les vertébrés.

L'étude de la réponse de l'ensemble moteurs-filament à des rampes alternées révèle que l'activité mécano-chimique des moteurs conduit à un comportement non linéaire de la relation force-vitesse du système, qui peut présenter un domaine de pente négative. Ce comportement non monotone fournit un mécanisme naturel pour expliquer l'apparition d'oscillations lorsque les moteurs et le filament d'actine sont couplés à un élément élastique.

Le système expérimental que nous avons utilisé est minimal, en ce sens qu'il ne contient aucun agent régulateur de l'interaction actine - myosine (protéines, calcium, mélange de nucléotides...). Ces expériences démontrent donc que le système actomyosine possède une aptitude naturelle à osciller spontanément, dès lors qu'une assemblée de moteurs est soumise à une force de rappel élastique, qui force les moteurs à opérer au voisinage de leur force d'arrêt.

Ces observations *in vitro* mettent en évidence un phénomène dont il faudra probablement tenir compte pour interpréter le comportement spontanément oscillatoire de systèmes physiologiques impliquant un grand nombre de moteurs non processifs.

L'application de marches alternées nous a permis d'étudier également la dynamique de la relaxation du système en réponse à une variation de la force appliquée autour de la force d'arrêt des moteurs. Cette relaxation se produit en deux phases, dont la plus rapide est caractérisée par des temps du même ordre de grandeur que les temps de relaxation passifs mesurés en l'absence d'ATP, de 100 à 200 μ s. La fraction de la relaxation totale due à la phase rapide est asymétrique et plus importante pour les marches dans la direction du mouvement naturel des moteurs en l'absence de force extérieure que pour les marches dans la direction opposée. Cette observation trahit une implication de l'activité des moteurs dans la phase rapide,

sur des échelles de temps bien plus brèves que celles que l'on pourrait naïvement estimer à partir des vitesses du mouvement produit par les moteurs en l'absence de force.

L'aptitude à osciller spontanément, ainsi que la faculté de développer une réponse mécanique sur des temps étonnamment brefs, sont deux manifestations des propriétés collectives qui apparaissent lorsqu'on impose à une assemblée de myosines II d'opérer au voisinage de leur force d'arrêt.

Ce travail n'est qu'un premier pas dans l'exploration de ces propriétés collectives. De nombreux aspects restent à éclaircir, en particulier définir précisément quels paramètres contrôlent le comportement oscillatoire des moteurs, et dans quelle gamme de ces paramètres des oscillations régulières apparaissent et se maintiennent. Enfin, toutes nos expériences ont été effectuées avec la myosine II du muscle squelettique, mais il se pourrait que les propriétés que nous avons mises en évidence soient communes à d'autres types de moteurs. La myosine 1c, dont l'activité régulée par le calcium est supposée sous-tendre le mécanisme des oscillations spontanées des touffes ciliaires, est un candidat intéressant pour tenter de reproduire et d'étoffer les résultats exposés dans cette thèse.

Annexes

A Composition des tampons

Tampon de stockage de l'actine G

- Tris-HCl pH 8,0 5 mM
- CaCl_2 : 0,2 mM
- ATP : 0,2 mM
- 5 % sucrose
- 1 % dextran

Tampon F

- Tris-HCl pH 7,4 : 50 mM
- KCl : 50 mM
- MgCl_2 : 1 mM
- CaCl_2 : 0,2 mM
- DTT : 0,5 mM

Tampon ABHS

- Imidazole-HCl pH 7,4 : 50 mM
- KCl : 500 mM
- MgCl_2 : 4 mM
- EGTA : 1 mM

Tampon AB

- Imidazole-HCl pH 7,4 : 50 mM
- KCl : 25 mM
- MgCl_2 : 4 mM
- EGTA : 1 mM

Tampon AB-BSA

- Tampon AB
- BSA : $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

Tampon AB-GOC

- Tampon AB
- Glucose oxidase : $0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Catalase : $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
- DTT : 40 mM
- Glucose : $9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

Tampon AB-GOC-CP

- Tampon AB-GOC
- Créatine Phosphate : 2 mM
- Créatine Phosphokinase : $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

B Comment calculer la distance focale d'un objectif de microscope ?

Un objectif de microscope est caractérisé par un grandissement G et une ouverture numérique. Cette dernière détermine la résolution spatiale de l'objectif, et par suite de l'ensemble de l'observation puisque c'est l'objectif qui présente la pupille diffractante la plus petite.

L'objectif forme une image à l'infini de l'objet étudié, et une deuxième lentille, la lentille de tube, refocalise cette image dans le plan d'une caméra, par exemple, ou dans le plan focal objet des oculaires. Le grandissement G est donc le rapport des distances focales, respectivement f'_{obj} et f'_T , de l'objectif et de la lentille de tube :

$$G = \frac{f'_T}{f'_{\text{obj}}}.$$

La focale de la lentille de tube dépend évidemment du constructeur :

Constructeur	f_T (mm)
Olympus	180
Zeiss	160
Leica	250
Nikon	200

Ainsi, un objectif d'une certaine marque utilisé sur un microscope d'une autre marque ne produira pas le grandissement indiqué.

C Traitement et transport des signaux délivrés par les photodiodes

Dans cette annexe nous détaillons la conception des circuits de traitement analogiques des signaux délivrés par les photodiodes à quatre quadrants qui mesurent le mouvement de billes piégées dans la pince optique. Nous mentionnerons les différents précautions que nous avons été amenés à prendre afin de limiter le plus possible la pollution de ces signaux par le bruit, afin d'effectuer une mesure de précision nécessaire pour atteindre la résolution nanométrique.

Chaque quadrant de la diode se comporte comme une photodiode simple, c'est-à-dire produit un courant proportionnel au flux lumineux qu'il reçoit. On récupère les courants émis par les quatre quadrants identiques, et on accède au déplacement de la bille dans les deux directions du plan en effectuant les opérations suivantes :

$$X \propto (i_A + i_B) - (i_C + i_D) \quad (\text{C-1})$$

$$Y \propto (i_A + i_D) - (i_B + i_C) \quad (\text{C-2})$$

Les courants issus de la photodiode sont traités en deux étapes.

1 Préamplification

Les courants produits par chaque quadrant sont faibles (quelques dizaines de nA), il faut donc les amplifier considérablement avant d'envisager de les transporter vers un circuit de traitement. Afin de limiter au maximum la pollution de ces petits courants par le bruit, ils sont recueillis dès la sortie de la diode par un convertisseur courant-tension avec gain. (Fig. C-1). Chaque courant i_i est donc converti

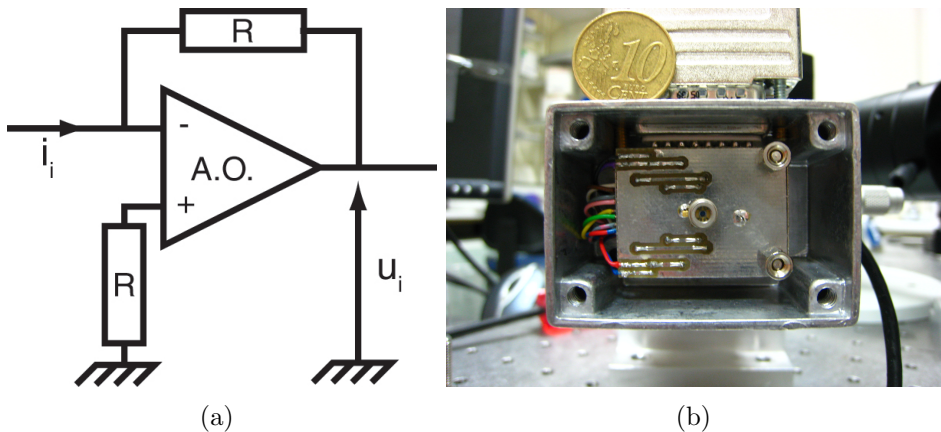


FIG. C-1: Circuit de préamplification

(a) Schéma du montage convertisseur courant-tension.

(b) Photo d'un boîtier contenant une photodiode et le circuit d'amplification des quatre courants

en une tension $u_i = Ri_i$. Le bruit thermique (ou bruit de Johnson) induit par la

résistance croissant comme \sqrt{R} , le rapport signal sur bruit de ce montage croît également comme \sqrt{R} . Nous avons choisi $R = 100 \text{ M}\Omega$ pour obtenir des tensions de 2 à 3 V. Cela dit, la présence d'une capacité parasite dans le circuit est inévitable, et combinée à une forte valeur de R , celle-ci entraîne une réduction de la bande passante. Il n'est pas possible de connaître la valeur de cette capacité, mais le meilleur moyen de la diminuer est de réduire le plus possible la surface du circuit. Le circuit de préamplification est donc réalisé sur un circuit imprimé avec des composants montés en surface (CMS), plus petits. L'amplification est effectuée par un circuit intégré (CMS AD8625, Analog Device) ; il comporte quatre amplificateurs caractérisés par un très faible bruit de courant en entrée et une tension de décalage également faible ($0,4 \text{ fA} \cdot \sqrt{\text{Hz}}$ et $0,35 \text{ mV}$ respectivement, d'après les données du fabricant). Il convient parfaitement à la fois à nos contraintes d'électronique de précision faible bruit et de compacité. Grâce à ce composant, la diode et le circuit de préamplification pour les quatre quadrants tiennent dans une boîte métallique de dimensions $5 \times 3,5 \times 3 \text{ cm}^3$, qui sert de cage de Faraday (Fig. C-1). Le masque permettant la gravure du circuit imprimé correspondant est donné plus loin.

Avant d'aller plus loin, nous allons ajouter quelques lignes pour discuter le choix que nous avons fait, comme d'autres groupes auparavant, de ne pas polariser les photodiodes. Cette discussion, que nous n'avons pas trouvée ailleurs, peut s'avérer utile à un lecteur qui, comme nous s'interrogerait sur la raison de ce choix. Quand on travaille avec une photodiode on a toujours le choix d'appliquer ou non une tension en inverse de la jonction pour la placer dans la bonne zone de sa caractéristique (ce qu'on appelle "polariser" la diode). A priori, si on la polarise son temps de montée diminue ; par ailleurs, le fait de la polariser ou non ne change pas le photocourant (Horowitz et Hill, 1989). En revanche, Horowitz et Hill préviennent (p. 996 de la même référence) qu'il faut faire attention à l'erreur que peut causer l'offset de l'amplificateur opérationnel (AO) utilisé dans le circuit d'amplification du photocourant, ou la tension de polarisation de la diode à cause de la résistance d'obscurité de la diode R_d . Dans une photodiode idéale, cette résistance d'obscurité est infinie, ce qui conduit à un courant nul en l'absence d'illumination. Il s'agit bien évidemment d'un modèle, et en pratique, pour les photodiodes que nous utilisons, $R_d = 10 \text{ G}\Omega$, ce qui est très grand en comparaison de résistances usuelles. Dans notre cas, le problème vient encore une fois des très grandes résistances que nous utilisons dans les circuits de préamplification. Si on imagine qu'on a polarisé la photodiode avec une tension U , le signal obtenu n'est plus $u_i = Ri_i$ où i_i est le courant produit par le i -ème quadrant, mais $u_i = (R/R_d)U + Ri_i$. Avec $R = 100 \text{ M}\Omega$, si $U = 10 \text{ V}$, le premier terme devient de l'ordre de 100 mV , ce qui n'est plus négligeable devant le deuxième. C'est probablement la raison pour laquelle, parmi les équipes qui utilisent cette technique, personne ne polarise la diode.

2 Transport

Les signaux amplifiés sont transmis au circuit de traitement analogique par un câble blindé, dont la tresse est reliée à la boîte contenant la diode. Dans le câble,

chaque tension u_i est transportée par deux conducteurs torsadés. Le fait d'utiliser une paire torsadée pour chaque signal limite la diaphonie³ entre les signaux pendant le transport. Ce câble transporte également l'alimentation (± 12 V) du circuit de préamplification.

3 Traitement analogique des signaux

Les opérations de soustraction et d'addition nécessaires sont effectuées de manière analogique. Ce circuit de traitement est monté sur un circuit imprimé double face, muni sur chaque face d'un plan masse faisant une cage de Faraday bidimensionnelle, placé à l'intérieur d'un boîtier métallique. Autant que possible, les pistes transportant les tensions d'alimentation des différents circuits intégrés utilisés et les pistes transportant les signaux utiles ont été séparées et se trouvent sur des faces différentes. Deux capacités de découplage de $0,1 \mu\text{F}$ filtrent les tensions d'alimentation de ± 15 V provenant d'une alimentation stabilisée bas bruit, destinées aux différents circuits intégrés utilisés. De plus chaque circuit intégré est lui-même muni de deux capacités de 22 nF au niveau de ses entrées d'alimentation. Ces précautions visent à filtrer les fluctuations dans les tensions continues d'alimentation, et à garantir ainsi un fonctionnement stable des composants. Le masque de ce circuit est donné plus loin. Chaque paire torsadée du câble provenant du boîtier de la photodiode est récupérée sur une fiche BNC isolée afin de prévenir la création de boucles de masse dans l'ensemble du circuit. Avant d'effectuer les opérations proprement dites, chaque paire est envoyée sur un amplificateur tampon (désigné comme "buffer" dans (Horowitz et Hill, 1989)) destiné à annuler la tension de "mode commun", c'est-à-dire une différence de potentiel non désirée qui puisse survenir entre la masse de la carte de traitement et celle du circuit de préamplification, qui sont théoriquement bien sûr au même potentiel. Conformément aux conseils de "The Art of Electronics", le signal correspondant et sa référence sont envoyés sur un amplificateur différentiel de gain unité à fort taux de réjection du mode commun (AMP03, Analog Device), à qui la masse du circuit de traitement est donnée comme référence (Fig. C-2).

Effectuer des sommations analogiques de manière précise est délicat car un montage sommateur à amplificateur opérationnel nécessite d'ajuster précisément les valeurs de résistance d'entrée afin qu'elles soient toutes identiques. Effectuer des soustractions est en revanche aisé en utilisant toujours des amplificateurs différentiels de gain unité AMP03, car ils sont munis de résistances internes parfaitement calibrées. Pour effectuer les opérations indiquées précédemment (Eq. C-1 et Eq. C-2), nous avons donc cherché à minimiser le nombre de sommations au profit des soustractions. Les opérations équivalentes que nous réalisons sont en réalité :

$$X \propto (u_A - u_C) + (u_B - u_D) \quad (\text{C-3})$$

$$Y \propto (u_A - u_B) + (u_D - u_C) \quad (\text{C-4})$$

Les quatre soustractions sont effectuées par des AMP03, et les deux additions par

³également appelée "crosstalk" dans les notices anglophones

un double amplificateur opérationnel OP270 (A.D.), avec un gain $\times 10$ pour obtenir des signaux de l'ordre de 1 V.

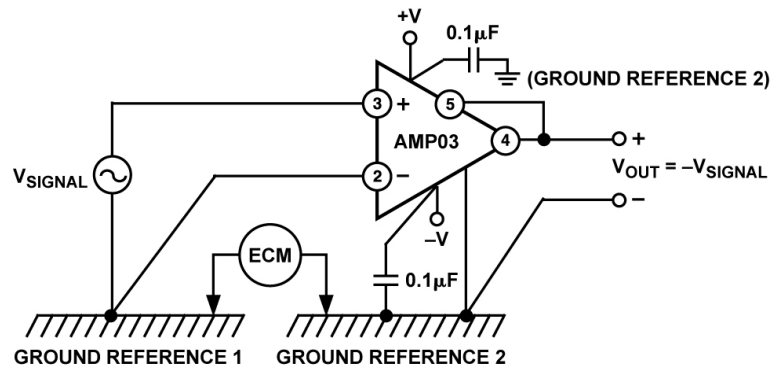


FIG. C-2: Utilisation des amplificateurs AMP03 comme tampons

E_{CM} est un générateur de tension symbolisant la tension de mode commun entre les références 1 et 2. La tension de mode commun provient par exemple de la circulation de courant d'une masse à l'autre. (Extrait de la notice des AMP03)

Nous donnons dans les pages suivantes les masques conçus pour la gravure du circuit imprimé effectuant le traitement analogique des signaux. Sur la première figure, les couches de cuivre supérieure (noire) et inférieure (bleue), correspondant aux deux faces du circuit imprimé, ainsi que la représentation des composants soudés sur le circuit (rouges) sont superposées, afin de donner une idée du fonctionnement du circuit. Les couches de cuivre sont ensuite données séparément, afin de pouvoir être éventuellement imprimées pour servir à la gravure de nouveaux circuits identiques.

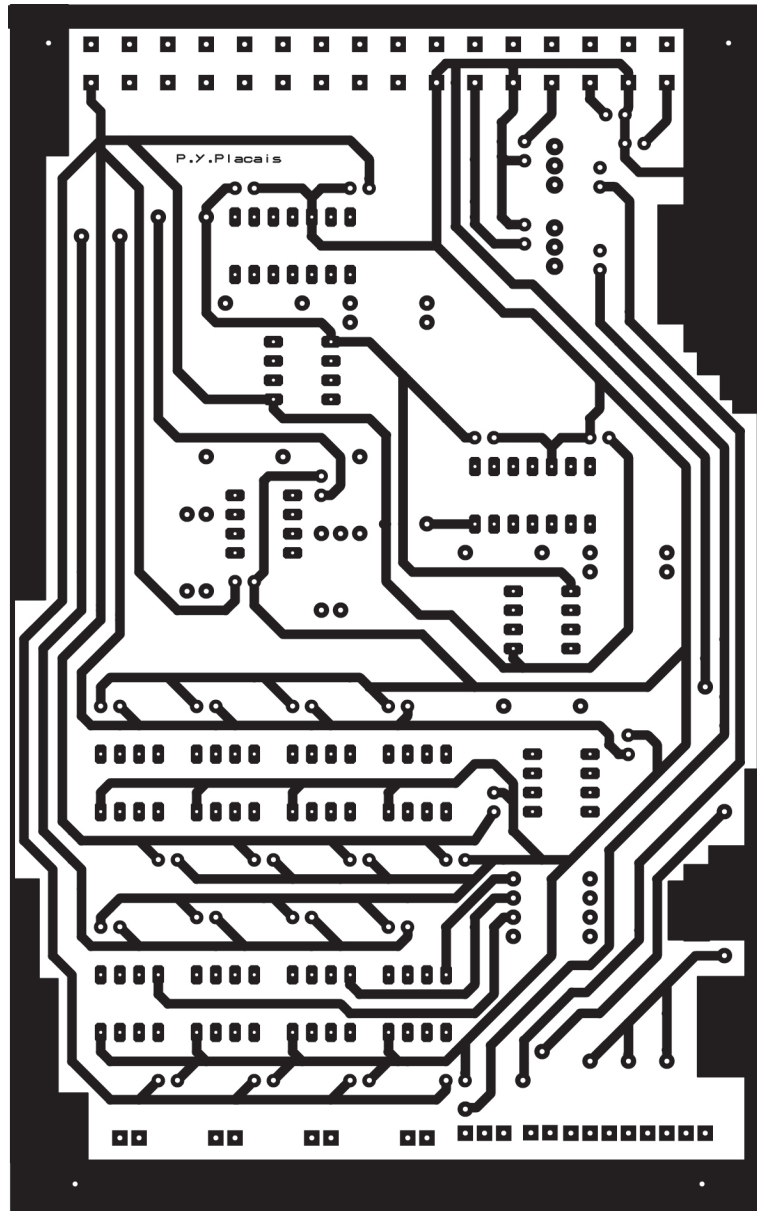


FIG. C-4: Circuit de traitement analogique : couche de cuivre supérieure.

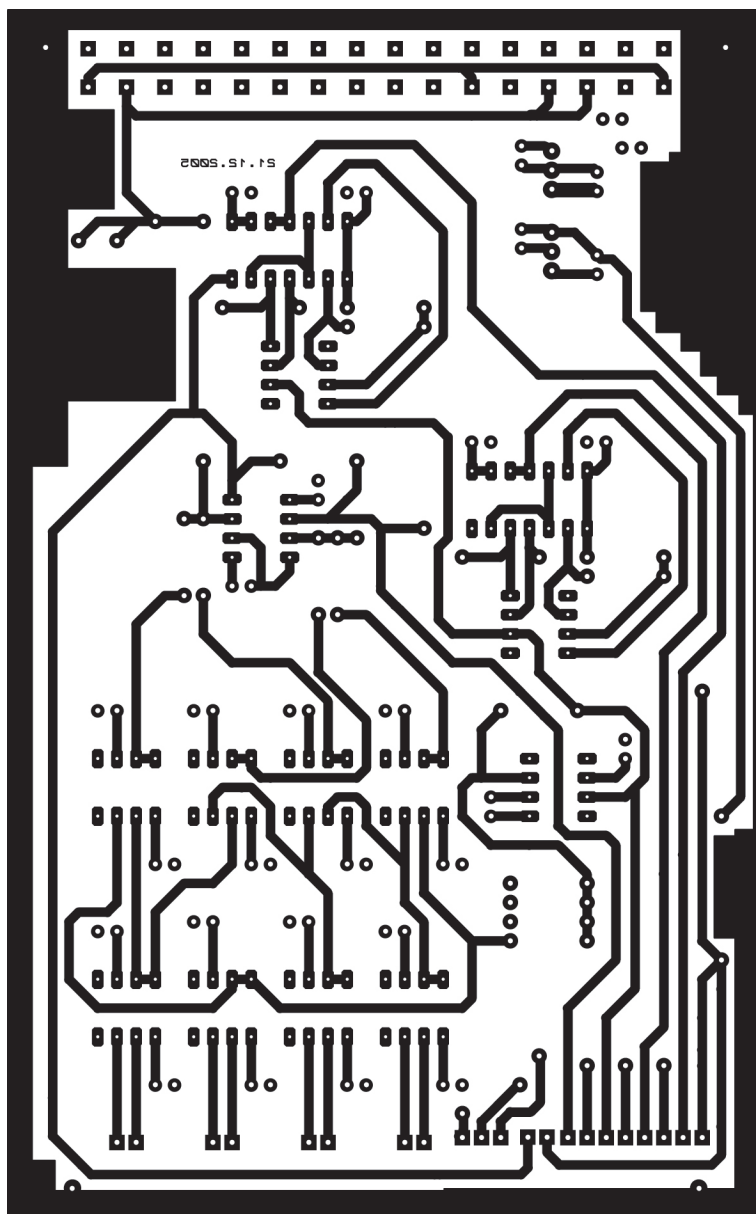


FIG. C-5: Circuit de traitement analogique : couche de cuivre inférieure.

D Circuit de détection d'accrochages en molécule unique

Nous donnons dans les pages suivantes les masques conçus pour la gravure du circuit imprimé effectuant la détection en temps réel d'accrochages en expériences de molécule unique. La détection d'accrochages s'effectue en comparant en temps réel la variance du mouvement d'une bille piégée à un seuil fixé par l'expérimentateur. Nous utilisons un convertisseur analogique "rms-dc" (AD536A, Analog Device), qui délivre une tension continue égale à la valeur quadratique moyenne de son signal d'entrée. La sortie de ce convertisseur est envoyée à un comparateur simple (LM193, National Semiconductor), dont le seuil est fixé manuellement par un potentiomètre. La sortie du comparateur se comporte donc comme un signal logique (0 ou 5 V) qui peut servir de signal de déclenchement pour une autre tâche.

Sur la première figure, les couches de cuivre supérieure (noire) et inférieure (bleue), correspondant aux deux faces du circuit imprimé, ainsi que la représentation des composants soudés sur le circuit (rouges) sont superposées, afin de donner une idée du fonctionnement du circuit. Les couches de cuivre sont ensuite données séparément, afin de pouvoir être éventuellement imprimées pour servir à la gravure de nouveaux circuits identiques.

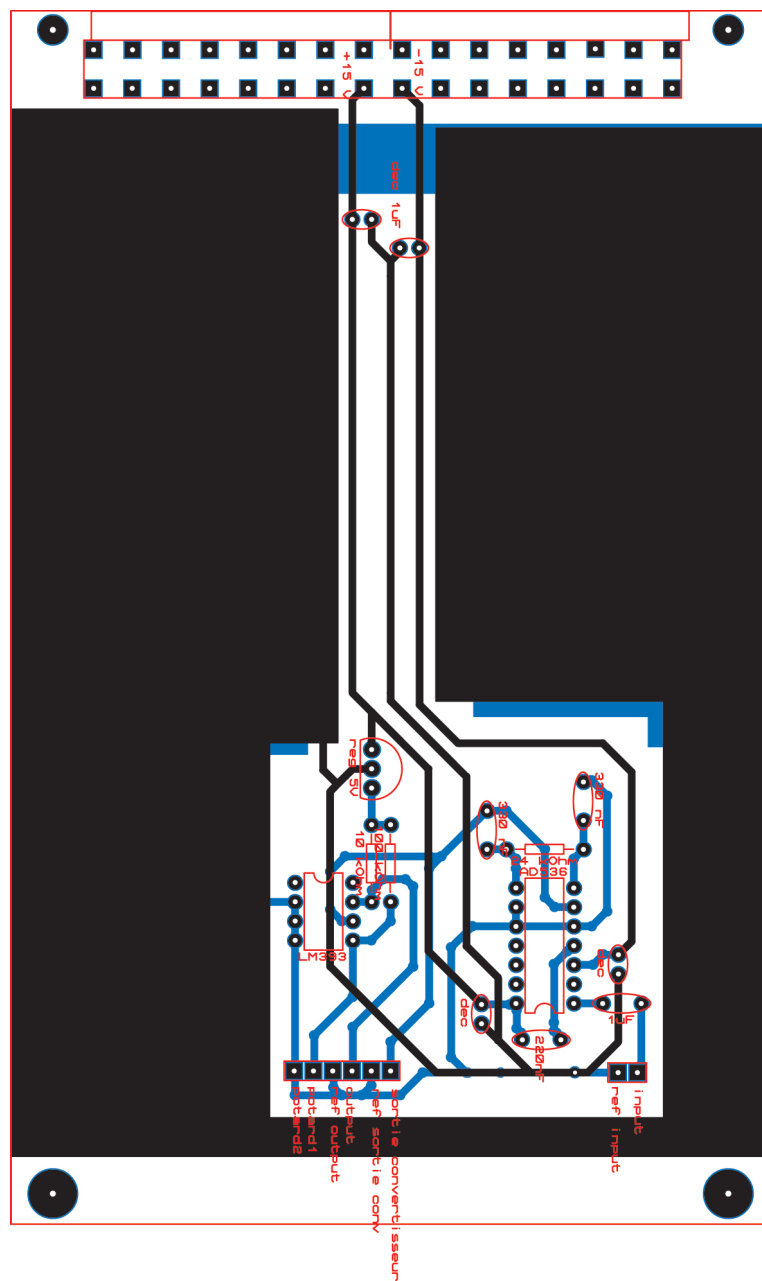


FIG. D-1: Circuit de détection d'accrochages : superposition des trois couches.

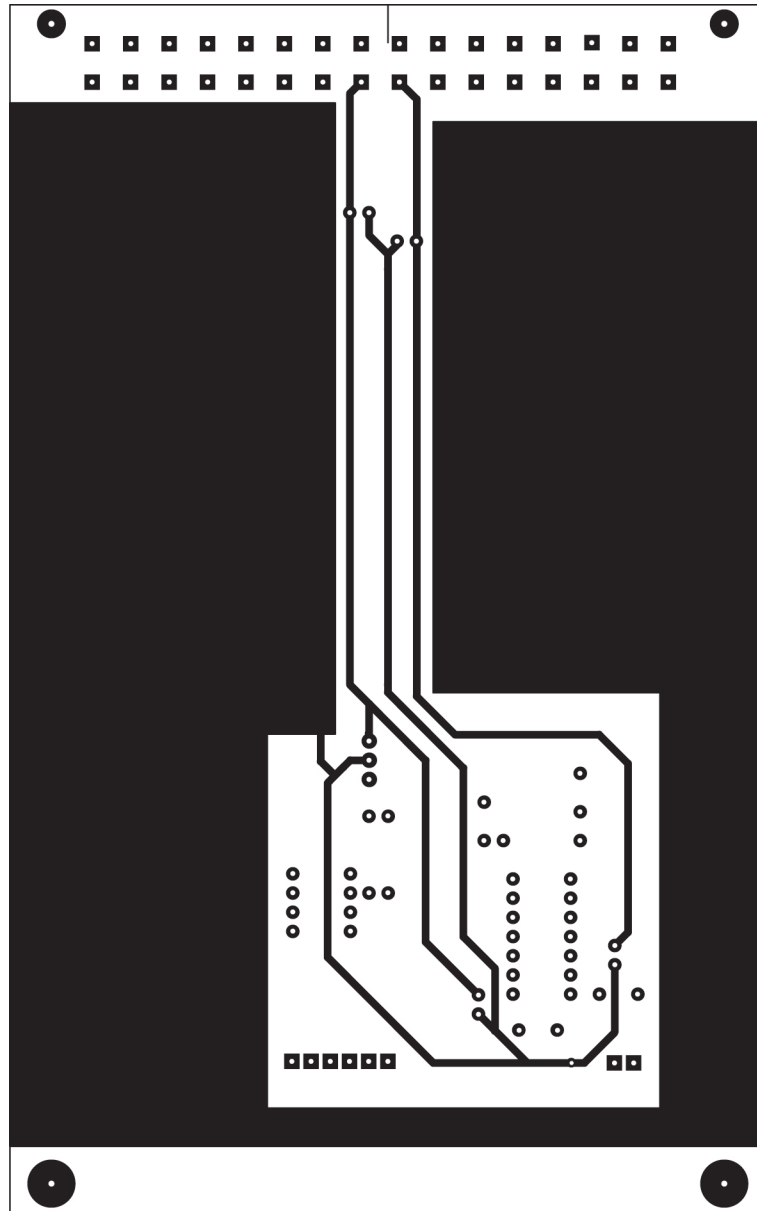


FIG. D-2: Circuit de détection d'accrochages : couche de cuivre supérieure.

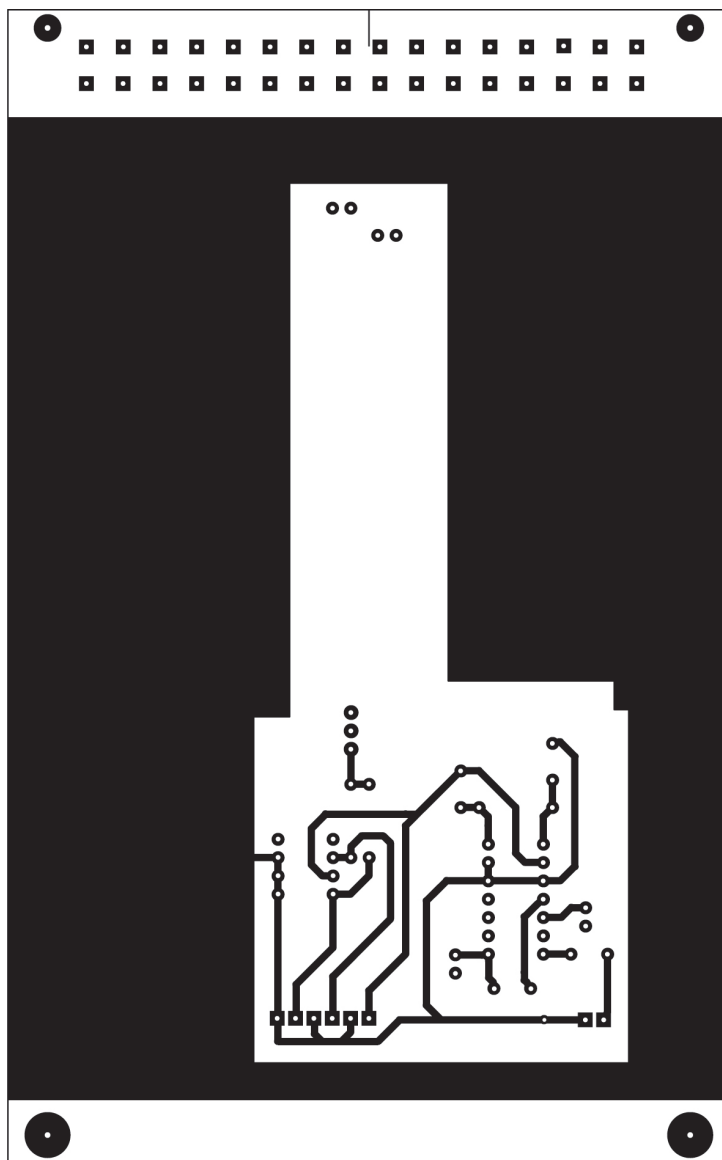


FIG. D-3: Circuit de détection d'accrochages : couche de cuivre inférieure.

E Rapidité et réactivité du programme d'interface

1 Position du problème

On exige *a priori* du programme qui gère l'interface qu'il soit à la fois rapide et réactif aux décisions de l'expérimentateur. Prenons un exemple pour préciser ces deux notions : afin de réaliser deux pièges, la commande de fréquence des DAO doit être un créneau d'au moins 10 kHz ; la tâche de génération correspondante doit donc être cadencée au moins à 20 kHz. La durée représentative de la rapidité du programme est Δt_S , l'intervalle entre deux échantillons générés. Plus le programme est rapide, plus Δt_S peut être petit. Par ailleurs, si à un instant quelconque l'expérimentateur souhaite déclencher une modulation sinusoïdale de l'un des deux pièges, la modification de la commande prend effet après une certaine durée Δt_R caractérisant la réactivité du programme. Là encore, plus il est réactif, plus Δt_R est faible. Dans le cas optimal, $\Delta t_R \leq \Delta t_S$, ce qui signifie que toute modification est prise en compte dès l'échantillon suivant.

On aimerait que les limitations viennent exclusivement des instruments eux-mêmes, c'est-à-dire pour reprendre le même exemple, que la fréquence maximale de pilotage des DAO soit déterminée par leur bande passante, et que le délai entre la décision de l'expérimentateur et son application effective au système étudié soit également dû au temps de réponse des appareils. Malheureusement, lors de la programmation du pilotage des cartes, rapidité et réactivité sont deux exigences contradictoires. Cela peut paraître surprenant dans la mesure où comme nous l'avons mentionné ci-dessus les cartes que nous utilisons atteignent des vitesses de cadencement très élevées (supérieures à 1 MHz). Mais ces performances ne traduisent que les propriétés des horloges et des convertisseurs analogiques-numériques embarqués sur les cartes. Le problème ne vient en fait pas des cartes elles-mêmes mais de la gestion des tâches par le système d'exploitation de l'ordinateur auquel elles sont connectées. Schématiquement, un système d'exploitation multi-tâches gère les différentes tâches qui lui sont assignées selon un ordre de priorité, ce qui signifie que Δt_S et Δt_R ne peuvent être simultanément arbitrairement faibles. Si la plus haute priorité est attribuée à détecter un ordre de l'expérimentateur, les ressources disponibles pour effectuer d'autres tâches à cadencement rapide sont limitées : Δt_R est privilégié par rapport à Δt_S . Réciproquement, s'il doit avec la plus haute priorité effectuer une tâche nécessitant un Δt_S petit, il met plus de temps à prendre en compte un changement externe de commande, Δt_R augmente. De plus, ce qui est peut-être pire que tout du point de vue expérimental, lorsque le système opère aux limites de ses capacités, ces durées ne sont absolument pas fixes.⁴

⁴Ce que le jargon des informaticiens traduit par "le système d'exploitation n'est pas déterministe."

2 Modes de cadencement des tâches

Les deux modes de cadencement de tâches proposés par LabView illustrent parfaitement le propos du paragraphe précédent. Le mode “avec buffer”⁵ privilégie la rapidité à la réactivité, alors que le mode “point par point” permet d’atteindre l’optimum de réactivité $\Delta t_R \leq \Delta t_S$. Pour expliquer nos choix de programmation, nous devons détailler le principe de ces deux modes.

– Mode avec buffer

Le principe d’une tâche (ici une génération de signal) fonctionnant sur le mode de cadencement avec buffer est illustré Fig. E-1.

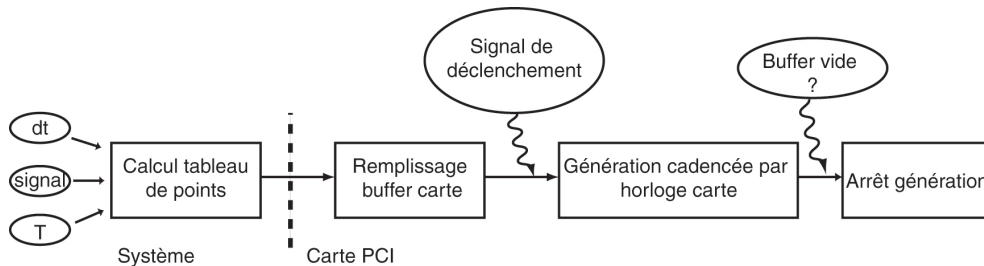


FIG. E-1: Diagramme de la génération d’un signal avec buffer

Le système calcule les points nécessaires à la génération du signal voulu pendant une durée T avec l’intervalle d’échantillonnage dt spécifié, puis l’envoi en bloc à la carte PCI qui le stocke dans son buffer. Après cela, le système d’exploitation n’intervient plus. Seule la carte est sollicitée et on peut profiter au maximum des performances de ses composants. C’est dans ces conditions qu’on peut atteindre les fréquences de cadencement très élevées données par le constructeur. Qui plus est, pendant le temps de la génération, les ressources du système d’exploitation sont complètement libres pour traiter d’autres tâches. On voit immédiatement, en revanche, qu’il est impossible de modifier un paramètre du signal produit avant que la génération ne soit achevée : $\Delta t_R \geq T$ ce qui donne une réactivité très mauvaise si le temps de génération est long. Il en va de même pour une acquisition avec buffer : on ne peut utiliser les valeurs acquises qu’une fois l’acquisition complète terminée. Cela rend par exemple impossible l’asservissement en temps réel du signal à une consigne.

En résumé, le mode avec buffer privilégie la rapidité ; il nous est utile pour de longues acquisitions en vue d’un traitement postérieur ou pour la génération de signaux préprogrammés.

– Mode point par point

Le fonctionnement d’une génération de signal en mode point par point avec cadencement matériel est radicalement différent sur le principe⁶. Comme son nom l’indique, le signal produit est calculé point par point et envoyé au fur et

⁵nous nous autorisons cet anglicisme largement répandu en informatique

⁶là encore, nous prenons l’exemple d’une génération, mais le principe d’une acquisition point par point est assez semblable

à mesure à la carte ; aucun buffer n'entre en jeu. Si on écarte les cas triviaux où on n'a besoin que de générer un point, ce mode requiert l'utilisation d'une boucle itérative (Fig. E-2).

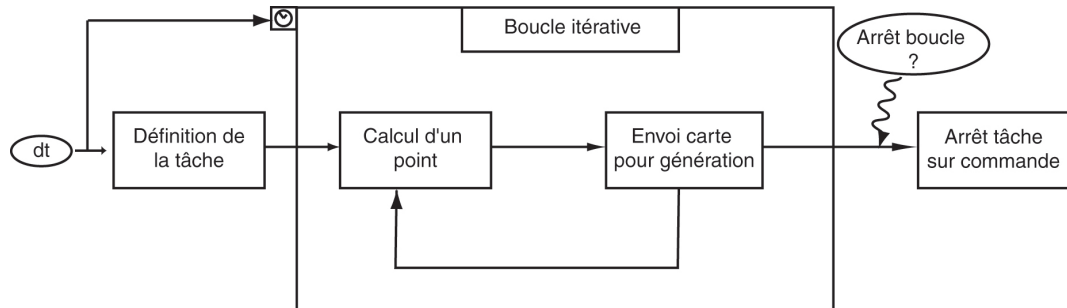


FIG. E-2: **Diagramme de la génération point par point d'un signal avec cadencement matériel**

Lors de la définition de la tâche, on configure la carte pour générer un échantillon à chaque “top” de son horloge. Cette horloge est également prise comme référence pour cadencer l'exécution de la boucle itérative

Il est clair que la réactivité offerte par ce mode où le signal est calculé en temps réel est optimale. Nous l'utilisons pour le pilotage des DAO, ce qui nous permet entre autres de rétroactionner la pince en position. Mais si le système n'arrive pas à suivre la vitesse de cadencement spécifiée, il peut se produire que la carte ne reçoive pas d'échantillon nouveau entre deux “tops” de son horloge. Selon la configuration choisie, soit elle arrête immédiatement la tâche en envoyant un message d'erreur, soit elle produit à nouveau l'échantillon précédent jusqu'à en recevoir un nouveau. Dans les deux cas, le programme ne se comporte pas comme prévu. La réactivité optimale se paye donc par une limite supérieure aux fréquences de génération ou d'acquisition possibles.

Il est à noter qu'une carte donnée ne peut effectuer simultanément deux tâches fonctionnant avec deux modes différents. Lors de nos premiers essais nous utilisions les trois cartes sur une seule machine fonctionnant avec LabView sous Windows XP, gérant à la fois les tâches avec buffer et point par point. Les premiers dysfonctionnements apparaissaient dès que la cadence de la boucle point par point dépassait 1 kHz!!

F Raideur d'un filament flexible

Dans cette annexe nous étudions la dynamique d'un filament flexible tenu à ses deux extrémités, et soumis à des fluctuations latérales thermiques.⁷ La longueur totale du filament est L_0 et la distance entre ses deux bouts est L . On appelle κ sa rigidité de courbure.

Le hamiltonien de ce système comprend un terme d'énergie élastique dû à la courbure locale du filament provoquée par les fluctuations, et un terme dû à la tension σ dans le filament. Dans le cas général, si s désigne l'abscisse curviligne le long du filament et \vec{r} la position absolue d'un point du filament, le hamiltonien s'écrit :

$$H = \frac{1}{2} \int_0^{L_0} ds \left[\kappa \left(\frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right)^2 + \sigma \right].$$

Dans l'approximation de petites fluctuations, on repère la déviation transverse du filament par $\vec{h}(x,t)$, et au premier ordre, le hamiltonien transverse devient :

$$H = \frac{1}{2} \int_0^L dx \left[\kappa \left(\frac{\partial^2 \vec{h}}{\partial s^2} \right)^2 + \sigma \left(\frac{\partial \vec{h}}{\partial x} \right)^2 \right].$$

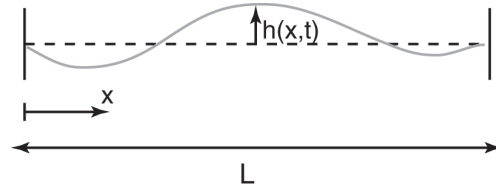


FIG. F-1: Schéma du système et notations utilisées.

Ce hamiltonien n'introduit pas de couplage entre les déviations dans les deux directions transverses orthogonales. Pour simplifier, nous considérons donc dans le calcul suivant un système bidimensionnel où les fluctuations n'ont lieu que dans un plan. Si $h(x,t)$ repère la déviation transverse du filament en chaque point (Fig. F-1) :

$$H = \int_0^L \frac{1}{2} \left(\kappa \left(\frac{\partial^2 h}{\partial x^2} \right)^2 + \sigma \left(\frac{\partial h}{\partial x} \right)^2 \right) dx.$$

On définit la transformée de Fourier de la manière suivante, pour les modes discrets de vecteur d'onde $q = \frac{n\pi}{L}$, $n \in \mathbb{Z}$:

$$h_q = \int_0^L h(x) e^{iqx} dx,$$

⁷Cette annexe a été rédigée avec l'aide de Guillaume Salbreux et l'appui du cours de Master II de Jean-François Joanny.

et la transformée de Fourier inverse

$$h(x) = \frac{1}{L} \sum_q h_q e^{-iqx}.$$

Le fait que $h \in \mathbb{R}$ entraîne la propriété importante $h_q = h_{-q}^*$.

On a :

$$\begin{aligned} \frac{\partial h}{\partial x} &= -\frac{i}{L} \sum_q q h_q e^{-iqx} \\ \frac{\partial^2 h}{\partial x^2} &= -\frac{1}{L} \sum_q q^2 h_q e^{-iqx} \end{aligned}$$

On peut alors écrire le hamiltonien dans l'espace de Fourier :

$$H = \frac{1}{2L^2} \sum_{qq'} \left[(\kappa q^2 q'^2 h_q h_{q'} - \sigma q q' h_q h_{q'}) \int_0^L e^{-i(q+q')x} dx \right].$$

Comme

$$\int_0^L e^{-i(q+q')x} dx = L \delta_{q,-q'},$$

on obtient,

$$H = \frac{1}{2} \sum_q \frac{\kappa q^4 + \sigma q^2}{L} |h_q|^2.$$

Ce hamiltonien est une somme de modes non couplés dépendant quadratiquement de l'amplitude des excitations. Le théorème d'équipartition de l'énergie indique que la valeur moyenne statistique de chacun de ces termes vaut $\frac{k_B T}{2}$, ce qui donne :

$$\langle |h_q|^2 \rangle = \frac{L k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2}. \quad (\text{F-1})$$

Si s désigne l'abscisse curviligne le long du filament, alors, avec le même degré d'approximation

$$L_0 = \int_0^{L_0} ds = \int_0^L \left(1 + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial h}{\partial x} \right)^2 \right) dx.$$

De la même manière que précédemment, on peut décomposer l'intégrale sur les modes de Fourier, ce qui donne :

$$L_0 = L + \frac{1}{2L} \sum_q q^2 |h_q|^2$$

En prenant la moyenne statistique, et en utilisant l'équation F-1, on obtient

$$L = L_0 - \frac{1}{2} \sum_q \frac{k_B T}{\sigma + \kappa q^2}.$$

Afin de faciliter le calcul, on passe à la limite continue⁸, avec la règle d'équivalence $1/L \sum_q \leftrightarrow 1/(2\pi) \int dq$:

$$L = L_0 \left(1 - \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{dq}{2\pi} \frac{k_B T}{\sigma + \kappa q^2} \right),$$

où l'on a utilisé $L \simeq L_0$ dans le second membre. Cette intégrale peut se calculer avec le changement de variable $u = q\sqrt{\kappa/\sigma}$:

$$L = L_0 \left(1 - \frac{k_B T}{4\pi\sqrt{\sigma\kappa}} \left[\arctan(u) \right]_{-\infty}^{+\infty} \right)$$

aboutissant à :

$$L = L_0 \left(1 - \frac{k_B T}{4\sqrt{\sigma\kappa}} \right).$$

On peut calculer la dérivée de L par rapport à σ :

$$\frac{\partial L}{\partial \sigma} = \frac{k_B T L_0}{8\sqrt{\kappa}} \sigma^{-3/2}.$$

La raideur longitudinale du filament est simplement l'inverse de cette grandeur :

$$k \equiv \frac{\partial \sigma}{\partial L} = \frac{8\sqrt{\kappa}}{k_B T L_0} \sigma^{3/2}. \quad (\text{F-2})$$

Pour un système tridimensionnel, si h_1 et h_2 désignent les déformations dans les deux directions transverses l'équation F-1 reste vraie pour chaque mode h_{1q} et h_{2q} . En revanche, la longueur du filament s'écrit :

$$L_0 = \int_0^L \left(1 + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial h_1}{\partial x} \right)^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial h_2}{\partial x} \right)^2 \right) dx.$$

Les deux termes apportent une contribution égale, qui se calcule comme ci-dessus ; on aboutit à

$$L = L_0 \left(1 - \frac{k_B T}{2\sqrt{\sigma\kappa}} \right),$$

si bien que pour un système tridimensionnel,

$$k \equiv \frac{\partial \sigma}{\partial L} = \frac{4\sqrt{\kappa}}{k_B T L_0} \sigma^{3/2}. \quad (\text{F-3})$$

⁸Posons $f(q) = \frac{1}{\sigma + \kappa q^2}$. On a $f(q + \delta q) \simeq f(q) + f'(q)\delta q$. La validité de la limite continue suppose qu'entre deux modes consécutifs ($\delta q = \pi/L$) la variation de $f(q)$ est faible, c'est-à-dire $f'(q)\pi/L \ll f(q)$. Cela donne $2\pi\kappa q/L \ll \sigma + \kappa q^2$. Cette dernière condition est vérifiée si $q \gg \pi/L$. Pour $q = \pi/L$, elle est vérifiée si $\sqrt{\frac{\kappa}{\sigma}} \ll L$. Pour un filament d'actine stabilisé avec de la phalloïdine, $\kappa = 7.10^{-26} \text{ Nm}^2$, et pour une tension $\sigma = 1 \text{ pN}$, $\sqrt{\frac{\kappa}{\sigma}} \simeq 250 \text{ nm}$. Si le passage à la limite continue n'est pas valide, on peut effectuer un développement de la somme en puissance de σ (MacKintosh et coll., 1995).

Bibliographie

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Watson, J. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 3ème édition.
- Allersma, M. W., Gittes, F., deCastro, M. J., Stewart, R. J., et Schmidt, C. F. (1998). Two-Dimensional Tracking of ncd Motility by Back Focal Plane Interferometry. *Biophys. J.*, **74**(2) p. 1074–1085.
- Armstrong, C. F., Huxley, A., et F.J., J. (1966). Oscillatory responses in frog skeletal muscle fibres. *Proceedings of the Physiological Society*, page 26P.
- Ashkin, A. (1970). Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.*, **24**(4) p. 156–159.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., et Chu, S. (1986). Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, **11**(5) p. 288.
- A.V.Hill (1938). The Heat of Shortening and the Dynamic Constants of Muscle. *Proceedings of the Royal Society B*, **126** p. 136–195.
- Badoual, M., Julicher, F., et Prost, J. (2002). Bidirectional cooperative motion of molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(10) p. 6696–6701.
- Batters, C., Arthur, C. P., Lin, A., Porter, J., Geeves, M. A., Milligan, R. A., Molloy, J. E., et Coluccio, L. M. (2004a). Myo1c is designed for the adaptation response in the inner ear. *EMBO J*, **23**(7) p. 1433–1440.
- Batters, C., Wallace, M. I., Coluccio, L. M., et Molloy, J. E. (2004b). A model of stereocilia adaptation based on single molecule mechanical studies of myosin I. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**(1452) p. 1895–1905.
- Berg-Sorensen, K. et Flyvbjerg, H. (2004). Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, **75**(3) p. 594–612.
- Blanchoin, L., Pollard, T. D., et Mullins, R. D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*, **10**(20) p. 1273–1282.
- Bourdieu, L., Duke, T., Elowitz, M. B., Winkelmann, D. A., Leibler, S., et Libchaber, A. (1995a). Spiral Defects in Motility Assays : A Measure of Motor Protein Force. *Phys. Rev. Lett.*, **75**(1) p. 176–179.
- Bourdieu, L., Magnasco, M. O., Winkelmann, D. A., et Libchaber, A. (1995b). Actin filaments on myosin beds : The velocity distribution. *Phys. Rev. E*, **52**(6) p. 6573–6579.

- Bray, D. (2001). *Cell Movements, from molecules to motility*. Garland Science, 2ème édition.
- Bray, D. et White, J. G. (1988). Cortical flow in animal cells. *Science*, **239**(4842) p. 883–888.
- Brenner, B., Schoenberg, M., Chalovich, J. M., Greene, L. E., et Eisenberg, E. (1982). Evidence for cross-bridge attachment in relaxed muscle at low ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**(23) p. 7288–7291.
- Brokaw, C. J. (1975). Molecular mechanism for oscillation in flagella and muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**(8) p. 3102–3106.
- Cai, Y., Biais, N., Giannone, G., Tanase, M., Jiang, G., Hofman, J. M., Wiggins, C. H., Silberzan, P., Buguin, A., Ladoux, B., et Sheetz, M. P. (2006). Non-muscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J*, **91**(10) p. 3907–3920.
- Capitanio, M., Canepari, M., Cacciafesta, P., Lombardi, V., Cicchi, R., Maffei, M., Pavone, F. S., et Bottinelli, R. (2006). Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(1) p. 87–92.
- Coluccio, L. M. et Geeves, M. A. (1999). Transient kinetic analysis of the 130-kDa myosin I (MYR-1 gene product) from rat liver. A myosin I designed for maintenance of tension? *J Biol Chem*, **274**(31) p. 21575–21580.
- Cooke, R. (1997). Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol Rev*, **77**(3) p. 671–697.
- Cooke, R. et Pate, E. (1985). The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophys J*, **48**(5) p. 789–798.
- Corey, D. P. et Hudspeth, A. J. (1983). Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. *J Neurosci*, **3**(5) p. 962–976.
- Cremonesi, C. R. et Geeves, M. A. (1998). Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin : implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle. *Biochemistry*, **37**(7) p. 1969–1978.
- Cruz, E. M. D. L. et Ostap, E. M. (2004). Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol*, **16**(1) p. 61–67.
- Denk, W. et Webb, W. W. (1989). Thermal-noise-limited transduction observed in mechanosensory receptors of the inner ear. *Phys. Rev. Lett.*, **63**(2) p. 207–210.
- Denk, W. et Webb, W. W. (1990). Optical measurement of picometer displacements of transparent microscopic objects. *Appl. Opt.*, **29**(16) p. 2382.
- Devroome, A. N. et MacIntosh, B. R. (2007). The biphasic force-velocity relationship in whole rat skeletal muscle in situ. *J Appl Physiol*, **102**(6) p. 2294–2300.
- Duke, T. (2002). Push or pull? Teams of motor proteins have it both ways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(10) p. 6521–6523.
- Duke, T. A. (1999). Molecular model of muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(6) p. 2770–2775.

- Eatock, R. A., Corey, D. P., et Hudspeth, A. J. (1987). Adaptation of mechano-electrical transduction in hair cells of the bullfrog's sacculus. *J Neurosci*, **7**(9) p. 2821–2836.
- Edman, K. A. (1988). Double-hyperbolic force-velocity relation in frog muscle fibres. *J Physiol*, **404**(1) p. 301–321.
- Edman, K. A. et Curtin, N. A. (2001). Synchronous oscillations of length and stiffness during loaded shortening of frog muscle fibres. *J Physiol*, **534**(Pt. 2) p. 553–563.
- Edman, K. A., Mulieri, L. A., et Scubon-Mulieri, B. (1976). Non-hyperbolic force-velocity relationship in single muscle fibres. *Acta Physiol Scand*, **98**(2) p. 143–156.
- Edman, K. A. P. et Hwang, J. C. (1977). The force-velocity relationship in vertebrate muscle fibres at varied tonicity of the extracellular medium. *J Physiol*, **269**(2) p. 255–272.
- Endo, M. (1972). Stretch-induced increase in activation of skinned muscle fibres by calcium. *Nat New Biol*, **237**(76) p. 211–213.
- Endow, S. A. et Higuchi, H. (2000). A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature*, **406**(6798) p. 913–916.
- Fabiato, A. et Fabiato, F. (1978). Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells. *J. Gen. Physiol.*, **72**(5) p. 667–699.
- Fenn, W. O. (1923). The relation between the work. *J Physiol*, **58**(2-3) p. 175–203.
- Fenn, W. O. (1924). The relation between the work performed and the energy liberated in muscular contraction. *J Physiol*, **58**(6) p. 373–395.
- Finer, J. T., Simmons, R. M., et Spudich, J. A. (1994). Single myosin molecule mechanics : piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, **368**(6467) p. 113–119.
- Florin, E., Moy, V., et Gaub, H. (1994). Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, **264**(5157) p. 415–417.
- Ford, L. E., Huxley, A. F., et Simmons, R. M. (1985). Tension transients during steady shortening of frog muscle fibres. *J Physiol*, **361** p. 131–150.
- Fujita, H. et Ishiwata, S. (1998). Spontaneous oscillatory contraction without regulatory proteins in actin filament-reconstituted fibers. *Biophys J*, **75**(3) p. 1439–1445.
- Fukuda, N., Fujita, H., Fujita, T., et Ishiwata, S. (1996). Spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. *Pflugers Arch*, **433**(1-2) p. 1–8.
- Gallet, F. (2004). Applications of optical tweezers and microspheres for the micro-manipulation of biomolecules and cells. *Ann Biol Clin (Paris)*, **62**(1) p. 85–86.
- Geeves, M. A. et Holmes, K. C. (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem*, **68** p. 687–728.

- Gillespie, P. G. et Corey, D. P. (1997). Myosin and adaptation by hair cells. *Neuron*, **19**(5) p. 955–958.
- Gillespie, P. G. et Cyr, J. L. (2004). Myosin-1c, the hair cell's adaptation motor. *Annu Rev Physiol*, **66** p. 521–545.
- Gillespie, P. G., Gillespie, S. K., Mercer, J. A., Shah, K., et Shokat, K. M. (1999). Engineering of the myosin- β nucleotide-binding pocket to create selective sensitivity to N(6)-modified ADP analogs. *J Biol Chem*, **274**(44) p. 31373–31381.
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., et Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, **120**(4) p. 923–934.
- Günther, S. et Kruse, K. (2007). Spontaneous waves in muscle fibres. *New Journal of Physics*, **9** p. 417.
- Goldman, Y. E. et Huxley, A. F. (1994). Actin compliance : are you pulling my chain? *Biophys. J.*, **67**(6) p. 2131–2133.
- Gollub, J., Cremo, C. R., et Cooke, R. (1996). ADP release produces a rotation of the neck region of smooth myosin but not skeletal myosin. *Nat Struct Biol*, **3**(9) p. 796–802.
- Gordon, A. M., Homsher, E., et Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*, **80**(2) p. 853–924.
- Gordon, A. M., Huxley, A. F., et Julian, F. J. (1966). The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J Physiol*, **184**(1) p. 170–192.
- Grill, S. W., Kruse, K., et Julicher, F. (2005). Theory of mitotic spindle oscillations. *Phys. Rev. Lett.*, **94** p. 108104.
- Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T. J., Cunningham, C. C., et Käs, J. (2001). The optical stretcher : a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophys J*, **81**(2) p. 767–784.
- Guo, B. et Guilford, W. H. (2004). The tail of myosin reduces actin filament velocity in the in vitro motility assay. *Cell Motil Cytoskeleton*, **59**(4) p. 264–272.
- Guo, B. et Guilford, W. H. (2006). Mechanics of actomyosin bonds in different nucleotide states are tuned to muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(26) p. 9844–9849.
- Haviv, L., Gillo, D., Backouche, F., et Bernheim-Groswasser, A. (2008). A cytoskeletal demolition worker : myosin II acts as an actin depolymerization agent. *J Mol Biol*, **375**(2) p. 325–330.
- Hellam, D. C. et Podolsky, R. J. (1969). Force measurements in skinned muscle fibres. *J Physiol*, **200**(3) p. 807–819.
- Higuchi, H., Yanagida, T., et Goldman, Y. E. (1995). Compliance of thin filaments in skinned fibers of rabbit skeletal muscle. *Biophys J*, **69**(3) p. 1000–1010.

-
- Horowitz, P. et Hill, W. (1989). *The Art of Electronics (Second Edition)*. Cambridge University Press.
- Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates.
- Howard, J. et Hudspeth, A. J. (1988). Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron*, **1**(3) p. 189–199.
- Howard, J., Hudspeth, A. J., et Vale, R. D. (1989). Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature*, **342**(6246) p. 154–158.
- Hudspeth, A. J. et Gillespie, P. G. (1994). Pulling springs to tune transduction : adaptation by hair cells. *Neuron*, **12**(1) p. 1–9.
- Huxley, A. F. (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem*, **7** p. 255–318.
- Huxley, A. F. (1974). Muscular contraction. *J Physiol*, **243**(1) p. 1–43.
- Huxley, A. F. et Simmons, R. M. (1971). Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*, **233**(5321) p. 533–538.
- Huxley, A. F. et Tideswell, S. (1996). Filament compliance and tension transients in muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, **17**(4) p. 507–511.
- Huxley, H. E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, **164**(886) p. 1356–1365.
- Huxley, H. E., Stewart, A., Sosa, H., et Irving, T. (1994). X-ray diffraction measurements of the extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle. *Biophys J*, **67**(6) p. 2411–2421.
- Isambert, H., Venier, P., Maggs, A. C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., et Carlier, M. F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem*, **270**(19) p. 11437–11444.
- Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H., et Yanagida, T. (1998). Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell*, **92**(2) p. 161–171.
- Ishijima, A., Kojima, H., Higuchi, H., Harada, Y., Funatsu, T., et Yanagida, T. (1996). Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle : unitary steps and forces. *Biophys J*, **70**(1) p. 383–400.
- Ishiwata, S., Shimamoto, Y., Suzuki, M., et Sasaki, D. (2007). Regulation of muscle contraction by Ca²⁺ and ADP : focusing on the auto-oscillation (SPOC). *Adv Exp Med Biol*, **592** p. 341–358.
- Jay, P. Y., Pham, P. A., Wong, S. A., et Elson, E. L. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci*, **108** (Pt 1) p. 387–393.

- Jülicher, F., Ajdari, A., et Prost, J. (1997). Modeling molecular motors. *Rev. Mod. Phys.*, **69**(4) p. 1269–1282.
- Jülicher, F. et Prost, J. (1995). Cooperative Molecular Motors. *Phys. Rev. Lett.*, **75**(13) p. 2618–2621.
- Jülicher, F. et Prost, J. (1997). Spontaneous Oscillations of Collective Molecular Motors. *Phys. Rev. Lett.*, **78**(23) p. 4510–4513.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., et Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin : DNase I complex. *Nature*, **347** p. 37–44.
- Kawai, M., Kawaguchi, K., Saito, M., et Ishiwata, S. (2000). Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles. *Biophys J*, **78**(6) p. 3112–3119.
- Kawai, M., Kido, T., Vogel, M., Fink, R. H. A., et Ishiwata, S. (2006). Temperature change does not affect force between regulated actin filaments and heavy meromyosin in single-molecule experiments. *J Physiol*, **574**(Pt 3) p. 877–887.
- Kennedy, H. J., Evans, M. G., Crawford, A. C., et Fettiplace, R. (2003). Fast adaptation of mechano-electrical transducer channels in mammalian cochlear hair cells. *Nat Neurosci*, **6**(8) p. 832–836.
- Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane, A. H., et Yanagida, T. (1999). A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature*, **397**(6715) p. 129–134.
- Kitamura, K. et Yanagida, T. (2003). Stochastic properties of actomyosin motor. *Biosystems*, **71**(1-2) p. 101–110.
- Kojima, H., Ishijima, A., et Yanagida, T. (1994). Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(26) p. 12962–12966.
- Kozuka, J., Yokota, H., Arai, Y., Ishii, Y., et Yanagida, T. (2006). Dynamic polymorphism of single actin molecules in the actin filament. *Nat Chem Biol*, **2**(2) p. 83–86.
- Kron, S. J. et Spudich, J. A. (1986). Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(17) p. 6272–6276.
- Kron, S. J., Toyoshima, Y. Y., Uyeda, T. Q., et Spudich, J. A. (1991). Assays for actin sliding movement over myosin-coated surfaces. *Methods Enzymol*, **196** p. 399–416.
- Linke, W. A., Bartoo, M. L., et Pollack, G. H. (1993). Spontaneous sarcomeric oscillations at intermediate activation levels in single isolated cardiac myofibrils. *Circ Res*, **73**(4) p. 724–734.
- Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G., et Baker, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol*, **42**(1) p. 1–29.
- MacKintosh, F., Käs, J., et Janmey, P. (1995). Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Phys Rev Lett*, **75**(24) p. 4425–4428.

- Margossian, S. S. et Lowey, S. (1982). Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol*, **85 Pt B** p. 55–71.
- Martin, P. (2008). *in Active processes and otoacoustic emissions*. Springer, New York.
- Martin, P., Bozovic, D., Choe, Y., et Hudspeth, A. J. (2003). Spontaneous oscillation by hair bundles of the bullfrog's sacculus. *J Neurosci*, **23**(11) p. 4533–4548.
- Martin, P. et Hudspeth, A. J. (1999). Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(25) p. 14306–14311.
- Martin, P. et Hudspeth, A. J. (2001). Compressive nonlinearity in the hair bundle's active response to mechanical stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(25) p. 14386–14391.
- Martin, P., Hudspeth, A. J., et Jülicher, F. (2001). Comparison of a hair bundle's spontaneous oscillations with its response to mechanical stimulation reveals the underlying active process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(25) p. 14380–14385.
- Martin, P., Mehta, A. D., et Hudspeth, A. J. (2000). Negative hair-bundle stiffness betrays a mechanism for mechanical amplification by the hair cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(22) p. 12026–12031.
- McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H. G., et Weeds, A. G. (1993). Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature*, **364**(6439) p. 685–692.
- Meeusen, R. et Cande, W. (1979). N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. A probe for actomyosin interactions. *J. Cell Biol.*, **82**(1) p. 57–65.
- Mehta, A. D., Finer, J. T., et Spudich, J. A. (1997). Detection of single-molecule interactions using correlated thermal diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(15) p. 7927–7931.
- Mehta, A. D., Finer, J. T., et Spudich, J. A. (1998). Use of optical traps in single-molecule study of nonprocessive biological motors. *Methods Enzymol*, **298** p. 436–459.
- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., et Cheney, R. E. (1999). Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*, **400**(6744) p. 590–593.
- Miyata, H., Yoshikawa, H., Hakozaiki, H., Suzuki, N., Furuno, T., Ikegami, A., Kinoshita (K), J., Nishizaka, T., et Ishiwata, S. (1995). Mechanical measurements of single actomyosin motor force. *Biophys J*, **68**(4-suppl) p. 286–290.
- Molloy, J. E. (1998). Optical Chopsticks : Digital Synthesis of Multiple Optical Traps. *Methods in Cell Biology*, **55** p. 205.
- Molloy, J. E., Burns, J. E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R. T., et White, D. C. (1995a). Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*, **378**(6553) p. 209–212.

- Molloy, J. E., Burns, J. E., Sparrow, J. C., Tregear, R. T., Kendrick-Jones, J., et White, D. C. (1995b). Single-molecule mechanics of heavy meromyosin and S1 interacting with rabbit or *Drosophila* actins using optical tweezers. *Biophys J*, **68**(4 Suppl) p. 298S–303S; 303S–305S.
- Neuman, K. C. et Block, S. M. (2004). Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, **75**(9) p. 2787–2809.
- Nishizaka, T., Miyata, H., Yoshikawa, H., Ishiwata, S., et Kinoshita, K. (1995). Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers. *Nature*, **377** p. 251–254.
- Nishizaka, T., Seo, R., Tadakuma, H., Kinoshita (Kazuhiko), J., et Ishiwata, S. (2000). Characterization of Single Actomyosin Rigor Bonds : Load Dependence of Lifetime and Mechanical Properties. *Biophys J*, **79**(2) p. 962–974.
- Nishizaka, T., Yagi, T., Tanaka, Y., et Ishiwata, S. (1993). Right-handed rotation of an actin filament in an in vitro motile system. *Nature*, **361**(6409) p. 269–271.
- Oiwa, K., Chaen, S., Kamitsubo, E., Shimmen, T., et Sugi, H. (1990). Steady-state force-velocity relation in the ATP-dependent sliding movement of myosin-coated beads on actin cables in vitro studied with a centrifuge microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(20) p. 7893–7897.
- Okamura, N. et Ishiwata, S. (1988). Spontaneous oscillatory contraction of sarcomeres in skeletal myofibrils. *J Muscle Res Cell Motil*, **9**(2) p. 111–119.
- Peterman, E. J. G., Gittes, F., et Schmidt, C. F. (2003). Laser-induced heating in optical traps. *Biophys J*, **84**(2 Pt 1) p. 1308–1316.
- Plastino, J. et Sykes, C. (2005). The actin slingshot. *Curr Opin Cell Biol*, **17**(1) p. 62–66.
- Pringle, J. W. (1978). The Croonian Lecture, 1977. Stretch activation of muscle : function and mechanism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **201**(1143) p. 107–130.
- Riveline, D., Ott, A., Jülicher, F., Winkelmann, D. A., Cardoso, O., Lacapère, J. J., Magnúsdóttir, S., Viovy, J. L., Gorre-Talini, L., et Prost, J. (1998). Acting on actin : the electric motility assay. *Eur Biophys J*, **27**(4) p. 403–408.
- Rohrbach, A. (2005). Stiffness of optical traps : quantitative agreement between experiment and electromagnetic theory. *Phys Rev Lett*, **95**(16) p. 168102.
- Rohrbach, A. et Stelzer, E. H. K. (2002). Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. *Appl Opt*, **41**(13) p. 2494–2507.
- Ruff, C., Furch, M., Brenner, B., Manstein, D. J., et Meyhöfer, E. (2001). Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat Struct Biol*, **8**(3) p. 226–229.
- Salbreux, G., Joanny, J. F., Prost, J., et Pullarkat, P. (2007). Shape oscillations of non-adhering fibroblast cells. *Phys Biol*, **4**(4) p. 268–284.
- Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S., et Kinoshita (Kazuhiko), J. (1997). Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(11) p. 5646–5650.

- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., et Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*, **365**(6449) p. 810–816.
- Sekimoto, K., Mori, N., Tawada, K., et Toyoshima, Y. Y. (1995). Symmetry Breaking Instabilities of an In Vitro Biological System. *Phys. Rev. Lett.*, **75**(1) p. 172–175.
- Shimamoto, Y., Kono, F., Suzuki, M., et Ishiwata, S. (2007). Nonlinear force-length relationship in the ADP-induced contraction of skeletal myofibrils. *Biophys J*, **93**(12) p. 4330–4341.
- Shimizu, H., Fujita, T., et Ishiwata, S. (1992). Regulation of tension development by MgADP and Pi without Ca²⁺. Role in spontaneous tension oscillation of skeletal muscle. *Biophys J*, **61**(5) p. 1087–1098.
- Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S., et Spudich, J. A. (1996). Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.*, **70**(4) p. 1813–1822.
- Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T., et Tanke, H. J. (1995). Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, **68**(6) p. 2588–2600.
- Song, L., Varma, C. A., Verhoeven, J. W., et Tanke, H. J. (1996). Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophys. J.*, **70**(6) p. 2959–2968.
- Spudich, J. A. (2001). The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(5) p. 387–392.
- Stauffer, E. A., Scarborough, J. D., Hirono, M., Miller, E. D., Shah, K., Mercer, J. A., Holt, J. R., et Gillespie, P. G. (2005). Fast adaptation in vestibular hair cells requires myosin-1c activity. *Neuron*, **47**(4) p. 541–553.
- Svoboda, K. et Block, S. M. (1994a). Biological Applications of Optical Forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **23**(1) p. 247–285.
- Svoboda, K. et Block, S. M. (1994b). Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell*, **77**(5) p. 773–784.
- Takagi, Y., Homsher, E. E., Goldman, Y. E., et Shuman, H. (2006). Force generation in single conventional actomyosin complexes under high dynamic load. *Biophys J*, **90**(4) p. 1295–1307.
- Tinevez, J.-Y. (2006). *Mouvements actifs, régulés par le calcium, de la touffe ciliaire des cellules ciliées mécano-sensorielles de l'oreille interne*. Thèse de doctorat, Université Denis Diderot (Paris 7).
- Tinevez, J.-Y., Jülicher, F., et Martin, P. (2007). Unifying the various incarnations of active hair-bundle motility by the vertebrate hair cell. *Biophys J*, **93**(11) p. 4053–4067.
- Toyoshima, Y. Y., Kron, S. J., McNally, E. M., Niebling, K. R., Toyoshima, C., et Spudich, J. A. (1987). Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature*, **328**(6130) p. 536–539.

- Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A., et Yanagida, T. (1996). Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(23) p. 12937–12942.
- Veigel, C., Bartoo, M. L., White, D. C. S., Sparrow, J. C., et Molloy, J. E. (1998). The Stiffness of Rabbit Skeletal Actomyosin Cross-Bridges Determined with an Optical Tweezers Transducer. *Biophys. J.*, **75**(3) p. 1424–1438.
- Veigel, C., Coluccio, L. M., Jontes, J. D., Sparrow, J. C., Milligan, R. A., et Molloy, J. E. (1999). The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature*, **398**(6727) p. 530–533.
- Veigel, C., Molloy, J. E., Schmitz, S., et Kendrick-Jones, J. (2003). Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers. *Nat Cell Biol*, **5**(11) p. 980–986.
- Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., et Sellers, J. R. (2005). Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol*, **7**(9) p. 861–869.
- Vilfan, A. et Duke, T. (2003). Instabilities in the transient response of muscle. *Biophys J*, **85**(2) p. 818–827.
- Visscher, K. et Block, S. M. (1998). Versatile optical traps with feedback control. *Methods in Enzymology*, **298** p. 460–489.
- Wakabayashi, K., Sugimoto, Y., Tanaka, H., Ueno, Y., Takezawa, Y., et Amemiya, Y. (1994). X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophys J*, **67**(6) p. 2422–2435.
- Whittaker, M., Wilson-Kubalek, E. M., Smith, J. E., Faust, L., Milligan, R. A., et Sweeney, H. L. (1995). A 35-A movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature*, **378**(6558) p. 748–751.
- Winkelmann, D. A., Bourdieu, L., Ott, A., Kinoshita, F., et Libchaber, A. (1995). Flexibility of myosin attachment to surfaces influences F-actin motion. *Biophys J*, **68**(6) p. 2444–2453.
- Wu, Y. C., Ricci, A. J., et Fettiplace, R. (1999). Two components of transducer adaptation in auditory hair cells. *J Neurophysiol*, **82**(5) p. 2171–2181.
- Yanagida, T., Esaki, S., Iwane, A. H., Inoue, Y., Ishijima, A., Kitamura, K., Tanaka, H., et Tokunaga, M. (2000). Single-motor mechanics and models of the myosin motor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**(1396) p. 441–447.
- Yanagida, T. et Iwane, A. H. (2000). A large step for myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(17) p. 9357–9359.
- Yasuda, R., Miyata, H., et Kinosita, K. (1996). Direct measurement of the torsional rigidity of single actin filaments. *J Mol Biol*, **263**(2) p. 227–236.
- Zhu, T., Sata, M., et Ikebe, M. (1996). Functional expression of mammalian myosin I beta : analysis of its motor activity. *Biochemistry*, **35**(2) p. 513–522.

Notations et abréviations

ADP : Adénosine Diphosphate
AFM : Microscopie à Force Atomique (Atomic Force Microscopy)
ATP : Adénosine triphosphate
BSA : Albumine de Sérum Bovin (Bovine Serum Albumin)
DAO : Déflecteur Acousto-Optique
DIC : Contraste Interférentiel Différentiel
DMNPE-ATP : Adénosine 5'-triphosphate,
P3-(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl) ester
DTT : Dithiothreitol
EGTA : Ethylène-Glycol-Tétracétate
HMM : Heavy MeroMyosin, méromyosine lourde
IR : Infrarouge
LMM : Light MeroMyosin, méromyosine légère
NEM : N-éthylmaléimide
PID : Proportionnel Intégral Dérivateur
 P_i : Phosphate inorganique
UV : Ultraviolet

Résumé

Les fibres musculaires et les touffes ciliaires mécanosensibles de l'oreille interne des vertébrés sont deux systèmes complexes capables de développer une activité mécanique spontanément oscillatoire, dans des conditions où, au niveau moléculaire, des groupes de moteurs moléculaires opèrent au voisinage de leur force d'arrêt et sont soumis à une force de rappel élastique. Nous avons construit un dispositif reproduisant *in vitro* une configuration semblable. Nous avons observé qu'une assemblée de myosines II musculaires, consommant de l'ATP en interagissant avec un filament d'actine, et soumise à une force de rappel élastique exercée par une pince optique, est un système minimal capable d'osciller spontanément. La relation force-vitesse du système présente un comportement non-monotone lié à l'activité des moteurs. Cette propriété fournit un mécanisme pour interpréter les oscillations spontanées, comme il l'a été suggéré par différentes études théoriques antérieures. La relaxation d'une assemblée de moteurs en réponse à un échelon de déplacement a aussi été examinée. Nos résultats suggèrent qu'au voisinage de leur force d'arrêt les propriétés collectives des moteurs leur permettent d'atteindre des cinétiques très rapides de l'ordre de 100 μ s. Par ailleurs, des expériences préliminaires à l'échelle de la molécule individuelle indiquent que la raideur de l'accrochage actine-myosine II pourrait dépendre de la tension imposée au filament d'actine. Cette propriété pourrait expliquer les écarts entre les raideurs mesurées *in vitro* et estimées à partir d'expériences sur les fibres musculaires.

Summary

Muscle fibres and hair bundles of the mechanosensitive hair cells from the vertebrates' inner ear both share the ability to oscillate spontaneously, under conditions where, at molecular level, groups of molecular motors operate near their stall force and are opposed an elastic restoring force. We have built an experimental setup to mimic *in vitro* such a configuration. We observed that an assembly of skeletal muscle myosin II, consuming ATP while interacting with an actin filament and submitted to an elastic restoring force exerted by an optical trap, is a minimal system able to exhibit spontaneous oscillations. The force-velocity relation of this system can show a non-monotonous behaviour, due to the motors' activity. This property provides a mechanism to interpret the spontaneous oscillations, as suggested by previous theoretical studies. We also studied the relaxation of a motor assembly to step displacements. Our results suggest that close to stall force, the collective properties of the motors allow them to reach kinetics as fast as 100 μ s. Preliminary experiments at single molecule level also indicate that the stiffness of an acto-myosin crossbridge might depend on the tension within the actin filament. This property could explain the discrepancy between values of stiffness measured *in vitro* and estimated from experiments on whole muscle fibres.