



HAL
open science

Systeme biomimetique d'intermediaires de transport tubulaires : Etude quantitative

Cécile Leduc

► **To cite this version:**

Cécile Leduc. Systeme biomimetique d'intermediaires de transport tubulaires : Etude quantitative. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005. Français. NNT: . tel-00426247

HAL Id: tel-00426247

<https://theses.hal.science/tel-00426247>

Submitted on 8 May 2013

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 7

Spécialité :

Physique des liquides

présentée par :

Cécile LEDUC

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 7

Sujet de la thèse :

**Système biomimétique
d'intermédiaires de transport
tubulaires : Étude quantitative**

soutenue le 03 juin 2005 devant le jury composé de :

M. François GALLET
M. François NEDELEC
M. Franck ARTZNER
M. Ulrich BOCKELMANN
M. Franck PEREZ
M. Manfred SCHLIWA
Mme Patricia BASSEREAU

Président
Rapporteur
Rapporteur

Directrice de thèse

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 1 |
| Introduction | 5 |
| 1 De la cellule vivante aux systèmes biomimétiques | 7 |
| A Trafic intracellulaire | 7 |
| A.1 Organisation de la cellule | 7 |
| A.2 Les voies d'endocytose et de biosynthèse-sécrétion | 9 |
| A.3 Les intermédiaires de transport | 12 |
| A.3.1 Forme vésiculaire | 12 |
| A.3.2 Forme tubulaire | 13 |
| A.4 Les principaux composants moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire | 18 |
| A.4.1 Formation et fusion des intermédiaires de transport | 18 |
| A.4.2 Déplacement des intermédiaires de transport | 22 |
| A.5 Les mécanismes de régulation du trafic | 28 |
| A.5.1 Mécanismes à l'échelle moléculaire | 29 |
| A.5.2 Mécanismes à l'échelle de la membrane | 32 |
| B Reconstitution <i>in vitro</i> des tubes de membrane | 35 |
| B.1 en utilisant des extraits de cellule | 35 |
| B.2 en utilisant uniquement les composants nécessaires | 39 |
| 2 Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane. | 43 |
| A Les microtubules, rails du trafic intracellulaire | 43 |
| A.1 Structure d'un microtubule | 43 |
| A.2 Fonctions dans la cellule | 45 |
| B Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos | 47 |
| B.1 Structure, fonction et propriétés physiques | 47 |
| B.1.1 Fonctions dans la cellule | 48 |
| B.1.2 Structure de la kinésine | 48 |
| B.1.3 Propriétés physiques | 50 |
| B.2 Etude cinétique, influence de la force appliquée et de la concentration en ATP | 54 |

| | | |
|-------|--|----|
| B.2.1 | ”Bead assay” ou ”gliding assay”, deux techniques pour caractériser la vitesse de la kinésine <i>in vitro</i> . | 55 |
| B.2.2 | Influence de la densité de moteurs : la vitesse des billes ou MTs ne dépend pas du nombre de moteurs qui tirent. | 56 |
| B.2.3 | Influence de la concentration en ATP : la vitesse sature à 1 mM d’ATP. | 57 |
| B.2.4 | Influence de la force appliquée sur la kinésine : la vitesse diminue et s’annule à -6 pN | 59 |
| B.3 | Taux de détachement et d’attachement d’une kinésine sur un microtubule | 62 |
| B.3.1 | Taux de détachement d’un microtubule | 62 |
| B.3.2 | Taux d’attachement sur un microtubule | 63 |
| B.3.3 | Influence de la force appliquée : le taux de détachement augmente exponentiellement | 63 |
| B.3.4 | Influence de la concentration en ATP sur le taux de détachement | 66 |
| B.3.5 | Influence de la présence de MAPs | 66 |
| B.4 | Modèle à deux états des moteurs moléculaires | 67 |
| C | Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques | 67 |
| C.1 | Les membranes biologiques | 68 |
| C.1.1 | Fonctions dans la cellule | 68 |
| C.1.2 | Composition complexe des membranes biologiques | 69 |
| C.1.3 | Organisation non homogène des lipides | 71 |
| C.2 | Les membranes artificielles : aspects microscopiques | 72 |
| C.2.1 | Du lipide au liposome | 72 |
| C.2.2 | Fluidité des membranes | 74 |
| C.3 | Caractéristiques macroscopiques des vésicules à l’équilibre | 76 |
| C.3.1 | Modélisation physique de la membrane | 77 |
| C.3.2 | Formes d’équilibre des vésicules | 84 |
| C.3.3 | Application d’une contrainte | 88 |

3 Etude théorique de l’extraction et la croissance de tubes de membrane 91

| | | |
|-------|---|----|
| A | Extraction d’un tube de membrane, statique | 91 |
| A.1 | Les premières expériences qui ont inspiré les premières théories | 91 |
| A.2 | Expression analytique de la force statique nécessaire pour extraire un tube de membrane | 92 |
| A.2.1 | Relation entre force appliquée sur la membrane et rayon du tube extrait | 93 |
| A.2.2 | Relation entre force appliquée sur la membrane et ses propriétés physiques | 94 |
| A.2.3 | Influence de la courbure non locale | 97 |
| A.3 | Formation et croissance de tubes de membrane | 98 |

| | | | |
|----------|-------|--|------------|
| | A.3.1 | Forme d'un tube de membrane | 98 |
| | A.3.2 | Courbe force-longueur de tube à tension constante | 100 |
| | A.3.3 | Relation force-longueur de tube à tension non fixée | 101 |
| | A.3.4 | Coalescence de deux tubes | 102 |
| B | | Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines | 104 |
| | B.1 | Pourquoi les lipides ne sont pas arrachés de la membrane par les kinésines | 104 |
| | B.1.1 | Temps de vie de la liaison kinésine-microtubule | 105 |
| | B.1.2 | Temps de vie d'un lipide biotinylé dans une membrane lipidique | 105 |
| | B.1.3 | Comparaison : la kinésine se détache avant d'arracher un lipide | 107 |
| | B.2 | Présentation du système vésicule-tube de membrane | 108 |
| | B.2.1 | Géométrie du système | 108 |
| | B.2.2 | Nécessité d'une accumulation dynamique des moteurs au bout du tube | 109 |
| | B.2.3 | Vitesse du tube | 110 |
| | B.3 | Dynamique d'extraction d'un tube de membrane, étude aux temps courts | 111 |
| | B.3.1 | Bilan de flux de moteurs au niveau du bout du tube | 111 |
| | B.3.2 | Description des phases hautes densités et basses densités de kinésines le long d'un MT | 112 |
| | B.3.3 | Densité de moteurs liés | 115 |
| | B.3.4 | Critères de formation d'un tube de membrane | 116 |
| | B.3.5 | Seuils d'existence de solutions | 118 |
| | B.3.6 | Stabilité des solutions obtenues | 120 |
| | B.3.7 | Nombre de moteurs qui tirent le tube | 122 |
| | B.4 | Dynamique de croissance d'un tube de membrane, étude aux temps longs | 123 |
| | B.4.1 | Bilan de flux de moteurs le long du tube | 124 |
| | B.4.2 | Expression des densité de moteurs le long du tube | 124 |
| | B.4.3 | Détermination du taux d'attachement des kinésines sur un MT | 127 |
| 4 | | Comment contrôler les paramètres physiques et biochimiques pertinents dans le système minimal <i>in vitro</i> | 129 |
| | A | Préparation des différents composants | 130 |
| | A.1 | Rappel sur le système expérimental | 130 |
| | A.2 | Les kinésines | 131 |
| | A.2.1 | Description du moteur utilisé | 131 |
| | A.2.2 | Description du plasmide codant pour la kinésine | 132 |
| | A.2.3 | Principe de la purification de la kinésine biotinylée | 133 |
| | A.3 | Les microtubules | 134 |
| | A.3.1 | Purification de la tubuline | 134 |

| | | | |
|-----|-------|--|-----|
| | A.3.2 | Polymérisation des MTs | 135 |
| | A.3.3 | Les différentes techniques d'accrochage de MTs | 136 |
| A.4 | | Les GUVs | 138 |
| | A.4.1 | Préparation par électroformation | 138 |
| | A.4.2 | Tension de membrane des vésicules électroformées | 139 |
| | A.4.3 | Les lipides utilisés | 140 |
| B | | Mesure des différents paramètres | 144 |
| | B.1 | Vitesse des kinésines - "bead assays" | 144 |
| | B.1.1 | Préparation des billes recouvertes de kinésines | 144 |
| | B.1.2 | Préparation d'une lamelle recouverte de MTs stabilisés | 145 |
| | B.1.3 | Injection des billes | 146 |
| | B.2 | Mesure du coefficient de diffusion des moteurs à la surface de la vésicule par FRAP | 147 |
| | B.2.1 | Photoblanchiment de molécules | 148 |
| | B.2.2 | Principe de la technique de FRAP | 148 |
| | B.2.3 | Application à la mesure du coefficient de diffusion D | 149 |
| | B.2.4 | Résultats obtenus pour D | 151 |
| | B.3 | Contrôle de la tension de membrane des vésicules | 153 |
| | B.3.1 | Principe général basé sur le phénomène d'osmose | 153 |
| | B.3.2 | Il faut imposer une différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule | 153 |
| | B.3.3 | Problème lié à la perméabilité parfois réduite des membranes lipidiques | 153 |
| | B.3.4 | Loi de Laplace | 155 |
| | B.4 | Mesure de la force nécessaire pour extraire un tube | 155 |
| | B.5 | Contrôle de la densité surfacique initiale de moteurs sur la vésicule | 158 |
| C | | Protocole pour former des tubes de membrane de façon contrôlée | 161 |
| | C.1 | Les différentes étapes du protocole de formation de tubes | 161 |
| | C.2 | Une journée d'expériences pour faire des tubes de membrane | 165 |
| | C.3 | Comparaison avec les protocoles plus anciens | 165 |
| | C.3.1 | Protocole de A. Roux et al. | 165 |
| | C.3.2 | Protocole de G. Koster et al. | 166 |

5 Etude expérimentale de l'extraction et de la croissance de tubes de membrane : Comparaison avec la théorie 169

| | | | |
|---|-------|--|-----|
| A | | Choix des paramètres suivant le type d'étude | 170 |
| | A.1 | Choix des lipides biotinylés | 170 |
| | A.2 | Choix de la tension de membrane | 171 |
| B | | Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane | 173 |
| | B.1 | Seuils d'extraction d'un tube de membrane | 174 |
| | B.1.1 | Seuil en tension de membrane pour une concentration surfacique de moteurs donnée | 174 |
| | B.1.2 | Seuil en concentration surfacique de moteurs pour une tension de membrane donnée | 175 |

| | | |
|-------|--|-----|
| B.1.3 | Comparaison avec la théorie | 177 |
| B.2 | Nombre de moteurs impliqués dans l'extraction d'un tube . . . | 177 |
| B.2.1 | Au seuil | 178 |
| B.2.2 | Loin du seuil | 178 |
| B.3 | Simulations | 180 |
| B.3.1 | Principe des simulations | 180 |
| B.3.2 | Description du seuil | 181 |
| B.3.3 | Détermination du nombre de moteurs qui tirent le tube | 182 |
| B.4 | Cas des vésicules rigides | 183 |
| C | Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube | 184 |
| C.1 | Résultats expérimentaux | 184 |
| C.1.1 | Films de croissance de tubes | 184 |
| C.1.2 | Remarque sur l'angle entre la vésicule et le tube de membrane | 187 |
| C.1.3 | Coalescence de tube | 189 |
| C.2 | Analyse | 189 |
| C.2.1 | Kymographes | 189 |
| C.2.2 | Profil d'intensité de fluorescence avec une croissance exponentielle | 190 |
| C.2.3 | Vitesse du bout du tube | 192 |
| C.2.4 | Expériences de contrôle | 193 |
| C.3 | Comparaison avec la théorie | 194 |
| C.3.1 | Détermination de k_b | 194 |
| C.3.2 | Comparaison de la longueur d'accumulation des moteurs et de la longueur correspondant aux moteurs qui tirent | 196 |
| C.4 | Comparaison avec les simulations | 197 |
| C.5 | Cas des vésicules rigides | 198 |
| C.6 | Embouteillage de moteurs le long d'un tube de membrane . . | 200 |
| C.6.1 | Inhomogénéités de fluorescence observées expérimentalement | 200 |
| C.6.2 | Interprétation | 201 |
| D | Etude aux temps très longs | 202 |
| D.1 | Observations expérimentales | 202 |
| D.1.1 | Arrêt d'un tube | 203 |
| D.1.2 | Oscillations de l'extrémité du bout du tube | 204 |
| D.2 | Analyse théorique | 205 |
| D.2.1 | Equations décrivant le système dynamique | 205 |
| D.2.2 | Intégration numérique | 207 |
| D.2.3 | Diagrammes de phases | 207 |
| D.2.4 | Remarque sur le seuil de formation d'un tube | 210 |

Table des matières

| | |
|---|-----|
| Annexes | 215 |
| A Les lipides | 215 |
| B Influence de la présence de moteurs moléculaires le long des micro-tubules dans un "bead assay" | 217 |
| C Purification de la kinésine | 219 |
| Notations et abréviations | 222 |
| Bibliographie | 224 |

Remerciements

Mon passage à l'Institut Curie touche à sa fin, et il m'est impossible de partir sans remercier tous les gens que j'ai rencontrés ici et qui ont participé à rendre ces quatre années si enthousiasmantes. Le mouvement perpétuel du laboratoire rend la liste un peu longue, j'espère n'oublier personne et si c'est le cas, veuillez m'excuser de cette maladresse.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement Jacques Prost et Jean-François Joanny pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. C'est dans leurs bureaux que la majeure partie du travail a été initiée, développée et a même abouti. Comment ne pas être passionnée par la recherche en côtoyant des gens comme vous ?

Ensuite, je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail : François Gallet qui a assuré la présidence en continuité avec la thèse d'Aurélien Roux, Franck Artzner et François Nédélec qui ont accepté la dure tâche de rapporteur (mon manuscrit était assez détaillé), Franck Pérez et Ulrich Bockelmann, qui ont apporté chacun un œil différent de biologiste et de spécialiste des études en molécule unique, et enfin Manfred Schliwa, un des plus grands spécialistes des moteurs moléculaires, qui nous a fait l'honneur de participer à cette manifestation. Merci à tous pour votre lecture attentive et la qualité de vos remarques lors de la soutenance.

Mes remerciements les plus sincères vont ensuite à Patricia, qui m'a accueillie dans son groupe et encadrée pendant ces quatre années. Merci pour ta disponibilité, ton dynamisme et tes conseils avisés qui sont bien entendus à l'origine de la réussite de tout projet. Merci aussi pour ta relecture attentive et perspicace de ce manuscrit.

Merci à Line Bourel-Bonnet, Pascale Jolimaître et Annick Blanpain qui ont accepté de passer plusieurs mois à synthétiser un lipide spécial sans lequel je n'aurais pas pu travailler. Cette collaboration a été, de mon point de vue, très fructueuse, j'espère qu'il en sera de même pour les collaborations futures. Merci aussi à François Nédélec et Thomas Surrey pour nous avoir fourni le plasmide de la kinésine. Bien entendu, je n'aurais rien pu faire sans...

Merci à Aurélien, qui a accepté le premier de partager son sujet avec moi. Merci de m'avoir enseigné l'art de faire des tubes. Nos sujets étaient à l'origine bien distincts mais ton goût pour la physique a largement mis en branle cette pré-répartition. Tes conseils de biologiste et ta grande culture d'expérimentateur ont été très utiles non seulement pour moi, mais pour l'ensemble du groupe.

Un grand merci à Otger grâce à qui ma thèse a pu décoller. Merci pour ta patience et ta disponibilité. Tes nombreuses qualités, à la fois humaines et de physicien, ont

Remerciements

largement contribué au plaisir que j'ai eu d'effectuer cette thèse. J'espère continuer à faire de belles expériences pour donner suite à cette riche collaboration.

Merci merci aussi à Aurélie, qui m'a tenu compagnie dans la galère des expériences de moteurs moléculaires. Forcément, ça crée des liens... Merci pour toute l'aide et le soutien que tu m'as apporté tout au long de ma thèse et bon courage pour la suite. Je me souviendrai toujours des cours de danse que tu m'as gentiment prodigués en attendant de voir un petit moteur avancer.

Que serait le groupe Bassereau sans la présence atypique de Pierre et Damien, qui, même du fond de leur cave, ont réussi à exporter leur rigueur et leur efficacité jusqu'aux étages de l'Institut. Comme dirait Patricia, j'ai eu du mal à passer la barrière, mais une fois franchie, vos conseils à la fois pratiques et scientifiques m'ont été très utiles pour finir mon travail de thèse. Qu'est-ce que ma thèse aurait été si j'avais plutôt commencé par venir vous voir ? Merci pour vos "chaleureux" accueils !

Il est maintenant temps de remercier le groupe Bassereau lui-même, dont j'ai pu suivre deux générations : la première, très sérieuse et très masculine (Jacques, Jérôme, Aurélien, Philippe, Sébastien) et la seconde, assez masculine aussi, mais plus délurée (Damien, Faris, Ludwig, Jean-Baptiste) que Pia a beaucoup enrichie par sa présence (j'ai beaucoup apprécié ces derniers mois passés dans notre petit bureau). Merci à tous pour votre aide, votre entourage, et votre bonne humeur, ce fut un plaisir de partager ces quelques années en votre compagnie. Bon courage à la nouvelle génération et à notre nouveau post-doc Gerbrand.

Un grand merci aussi au groupe de Bruno Goud, qui a accepté mon incursion dans leur laboratoire de Biologie quand j'avais besoin de faire mes nombreuses purifications de kinésines. Merci à Florence, Solange, Annick, Stéphanie et les autres pour votre aide et vos conseils, et un grand merci à Arnaud qui a accepté de relire mon premier chapitre (de biologie) avec toute la clémence nécessaire par une telle occasion. J'ai toujours essayé d'être discrète et ordonnée pour ne pas malmenager les bonnes relations qui s'établissent petit à petit entre nos deux laboratoires.

Merci à Olivia qui, la première, m'a initiée aux joies du laboratoire. Merci aussi à Konstantin qui a passé beaucoup de temps à mettre en place "le programme de tracking" qui m'a permis mes premières analyses. Merci à Sylvie qui m'a initiée à la technique de FRAP biphotonique avec beaucoup de patience. Merci à Hadia pour tous ses bons produits et ses bons conseils. Merci à Ewa pour son soutien permanent et essentiel. J'espère qu'on continuera à prendre des p'tits thés à Dresde... Merci aux copains théoriciens Philippe et Boris, aux copains expérimentateurs (tout groupe et tout étage confondu) Léa, Jean-Yves, Willy, Francois, les trois Nicolas, Jérémie, Pierre-Yves, Martial, Johan, Matthieu, Juliette, Hakim etc., à ma voisine de bureau préférée Emilie, ma compagne de bureau temporaire Clémentine, à mon coach Simon et à tous ces jeunes qui participent à créer une bonne ambiance à l'Institut.

Merci aussi à tous les permanents : Jacques M., Patrick, Min hui, Nelly, Giovanni, Jean-Louis (les deux), Daniel, Pascal, Pascal, Julie, Francois etc. avec qui j'ai interagi de façon très cordiale voire chaleureuse. Je tiens à remercier spécialement Cécile S. dont les encouragements m'ont beaucoup aidée, particulièrement pendant mes premières années de thèse.

Il est important de mentionner aussi que le bon déroulement de la vie au labo-

ratoire est ne serait pas possible sans les gens de l'atelier (Michel, Gilles et Benoit), les secrétaires (Nicole, Françoise et Francine), ainsi que Brigitte et son gentil sourire matinal, Monsieur Suchet toujours prêt à aider, Jean-Hugues et toute l'équipe informatique permanente, efficace et fort sympathique. Merci Mansour et Francois-David pour avoir essayé de sauver mon ordinateur de la noyade. Merci aussi à Stéphane, Jean-Gabriel, Vincent et Guillaume d'avoir essayé de me nourrir pendant cette dure période qu'est la rédaction (merci à Othman au passage qui reste le fin cuisinier du soir à l'Institut).

Merci aussi à toute la plate-forme d'imagerie (Jean-Baptiste Sibarita, Vincent Fraisier et Jean Salamero), qui, en créant et maintenant à notre disposition un appareillage très performant, ont largement participé à la qualité de mon travail.

Je remercie chaleureusement enfin le groupe de Marileen Dogterom à Amolf (Amsterdam) dont Gerbrand et Martijn. Nous aurions pu être concurrents mais la finesse de nos chefs a transformé cette compétition en collaboration complémentaire. Merci d'avoir tenu bon quand la polémique " bille-pas de bille " était encore d'actualité, c'est grâce à vous que j'ai pu faire toute la suite.

J'ai passé beaucoup d'heures (trop ?) au laboratoire ; je remercie chaleureusement ma famille et mes amis de m'en avoir fait sortir. J'ai eu la grande chance d'avoir mes deux grands-parents présents le jour de ma soutenance, accompagnés par mes parents, oncle et tantes. Un grand merci aussi à tous mes amis lyonnais pour les fameux dîners gastronomiques et les déjeuners ensoleillés, merci à Djamé et sa page web qui remonte le moral, à Pauline et Karim pour leur enthousiasme communicatif et enfin à Stéphane, qui m'a accompagnée jusqu'au bout.

Introduction

L'étude du transport de membrane remonte à l'époque où la constitution de la membrane n'était même pas encore complètement claire. À partir des années 50, le développement des outils d'observation, comme la microscopie électronique, combiné aux méthodes de fixation des cellules, qui permettaient de préserver les membranes, marque un tournant dans la recherche en biologie cellulaire. En effet, la cellule s'est avérée être composée d'une abondance de compartiments membranaires impliqués dans les processus de sécrétion et d'endocytose. L'étude des mécanismes du transport intracellulaire au niveau moléculaire et biochimique a débuté dans les années 80 avec le développement de l'utilisation de cultures cellulaires, du clonage moléculaire ou de la reconstitution *in vitro* d'événements complexes de transport de membrane à partir de constituants purifiés, entre autres. Le passage de clichés statiques à l'observation dynamique, sur des cellules vivantes, des composants impliqués dans le trafic a beaucoup accéléré la compréhension des mécanismes mis en jeu. Il a permis notamment de mettre en évidence des intermédiaires de transport tubulaires hautement dynamiques qui relient les différents compartiments d'une cellule. Ces observations allaient à l'encontre de la représentation qu'on se faisait du trafic de membrane à ce moment là. On pensait qu'il était effectué par de petites vésicules se formant au niveau d'un compartiment donneur, puis transportées jusqu'au compartiment accepteur avec lequel elles fusionnent. En fait, les deux types d'intermédiaires de transport coexistent probablement, et ont chacun leur rôle dans la cellule, mais l'observation même de ces tubes justifiait qu'on s'attarde à comprendre leur formation.

Comme bien souvent dans la cellule, qui dit "mouvement" dit "moteur moléculaire". Le fait qu'on ait réussi à isoler ces petites machines a permis de faire un grand pas dans la compréhension des mécanismes de transport de membrane. A ce titre, les kinésines sont particulièrement intéressantes car elles sont capables de générer suffisamment de force pour déplacer des cargos à travers la cellule le long du réseau de microtubules. Les moteurs moléculaires ne sont cependant pas les seules molécules impliquées dans le trafic. Beaucoup d'autres protéines ont aussi été découvertes jouant un rôle important à différentes étapes du transport de membrane. C'est pourquoi, pour déterminer exactement les composants nécessaires à la formation des tubes, l'idée est venue de mettre au point un système minimal qui mimerait leur formation *in vitro* avec uniquement des composants purifiés. Les principaux candidats étaient bien sûr : les kinésines, les microtubules, puis le choix du réservoir de membrane mimant les compartiments cellulaires s'est porté sur les vésicules géantes unilamellaires, qui sont des systèmes modèles dont les propriétés physiques

sont très bien connues à l'heure actuelle. Pour mener à bien ce projet, il a fallu mettre en commun les connaissances complémentaires de trois groupes de recherche de l'Institut Curie : le groupe d'expérimentateurs de Patricia Bassereau, spécialisé dans la physique des membranes, le groupe de biologistes de Bruno Goud, spécialisé dans le trafic intracellulaire et le groupe de théoriciens de Jacques Prost, spécialisé dans les moteurs moléculaires et les membranes. En combinant les expériences des différents groupes, A. Roux a ainsi réussi à mettre au point ce système minimal et à obtenir des premières observations.

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ce projet. Une fois les tubes de membrane observés, nous avons voulu comprendre de façon quantitative le rôle des différents paramètres physiques et biochimiques impliqués. Mon travail a donc consisté à trouver une façon de contrôler ces différents paramètres pour pouvoir les faire varier de façon indépendante et comprendre leur influence sur les différentes étapes de formation et de croissance de tubes de membrane. Ce travail a été mené en parallèle avec une analyse théorique, réalisée dans le groupe de théorie de Jacques Prost et Jean-François Joanny et c'est la confrontation des résultats expérimentaux et des résultats théoriques qui a permis de donner une nouvelle description du transport de membrane basée sur le comportement collectif des moteurs moléculaires impliqués. Le contexte biologique de ce travail sera développé dans le premier chapitre, qui retracera notamment la découverte des tubes de membranes *in vivo* ainsi que le rôle des moteurs moléculaires, et montrera quelles sont les limitations des études *in vivo* auxquelles les études *in vitro* peuvent palier. Le deuxième chapitre aura pour but de décrire de façon plus précise les différents composants impliqués dans le système minimal : les microtubules, les kinésines et les vésicules. Ce chapitre détaillera les différentes propriétés physiques et biochimiques de ces composants qui jouent un rôle dans le transport de membrane. Le chapitre trois permettra de mettre en place toute l'analyse théorique nécessaire pour comprendre comment les moteurs sont capables de s'associer pour tirer des tubes. Ce chapitre s'attardera aussi sur le développement historique de la physique des tubes de membrane. Dans le chapitre quatre, la mise en place du système expérimental sera décrite, et il sera montré plus particulièrement comment nous avons eu accès à l'ensemble des paramètres importants. Une fois tout ce système mis en place, nous verrons dans la chapitre cinq comment il est possible de décrire de façon précise les différentes étapes de formation et de croissance des tubes de membrane.

Chapitre 1

De la cellule vivante aux systèmes biomimétiques

Les caractéristiques fondamentales qui définissent le vivant et qui fédèrent, semble-t-il, un bon nombre de chercheurs sont l'autoconservation (récupérer des éléments du milieu et les transformer en produits nécessaires à la survie), l'autorégulation (contrôler la fabrication de ces produits) et l'autoreproduction (produire un système ayant ces trois caractéristiques). Tout système qui ne posséderait pas ces trois fonctions autonomes ne serait pas vivant, comme un virus par exemple qui n'a pas d'autoconservation. Les cellules sont les plus petits organismes vivants qui existent. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories : les cellules possédant un noyau appelées "eucaryotes" (comme les cellules nerveuses, germinales, musculaires, épithéliales etc.) et les cellules sans noyau appelées "procaryotes" (comme les bactéries). Les cellules eucaryotes sont des organismes beaucoup plus complexes que les cellules procaryotes puisqu'elles font intervenir beaucoup plus de composants moléculaires et comprennent des compartiments, ou organites, limités par une membrane. Les différents organites ont des fonctions distinctes mais qui sont très dynamiques ; ils doivent échanger de façon permanente des protéines, des glucides et des lipides pour communiquer tout en maintenant leur intégrité. Ce trafic intracellulaire s'effectue par des voies de sécrétion et d'endocytose qui seront présentées en première partie. Nous verrons d'abord qu'il fait intervenir des intermédiaires de transport vésiculaires ou tubulaires ainsi qu'une grande quantité de protéines impliquées dans la formation de ces intermédiaires, leur extension, leur fission et leur fusion. Pour élucider les mécanismes principaux de ce trafic, nous verrons dans une seconde partie l'intérêt de reconstituer *in vitro* les étapes clés du transport, de façon à déterminer les composants essentiels impliqués.

A Trafic intracellulaire

A.1 Organisation de la cellule

Les différents compartiments d'une cellule eucaryote sont représentés figure 1.1 dans l'exemple d'une cellule de mammifère. Ils sont séparés par une, voire deux

membranes. On distingue [Alberts et al., 1995] :

- le noyau enveloppé d'une double membrane, qui contient la plus grande partie de l'ADN cellulaire
- des mitochondries, aussi entourées d'une double couche membranaire, spécialisée dans la synthèse de l'ATP, source d'énergie de la cellule
- le réticulum endoplasmique (RE), réseau de feuillettes aplatis entouré d'une membrane, qui est spécialisé dans la synthèse et le transport de lipides et de protéines membranaires
- l'appareil de Golgi, système de "sacs" entourés d'une membrane [Golgi, 1898], impliqué dans la modification, le tri et l'emballage de molécules qui doivent être transportées vers d'autres organites ou vers la membrane plasmique
- des endosomes qui sont des petits compartiments membranaires (200 à 500 nm de diamètre) de transport entourés d'une membrane, ainsi que des lysosomes et des peroxysomes, vésicules contenant des enzymes hydrolytiques impliquées dans les digestions intracellulaires pour les premières et des enzymes oxydatives pour les secondes.

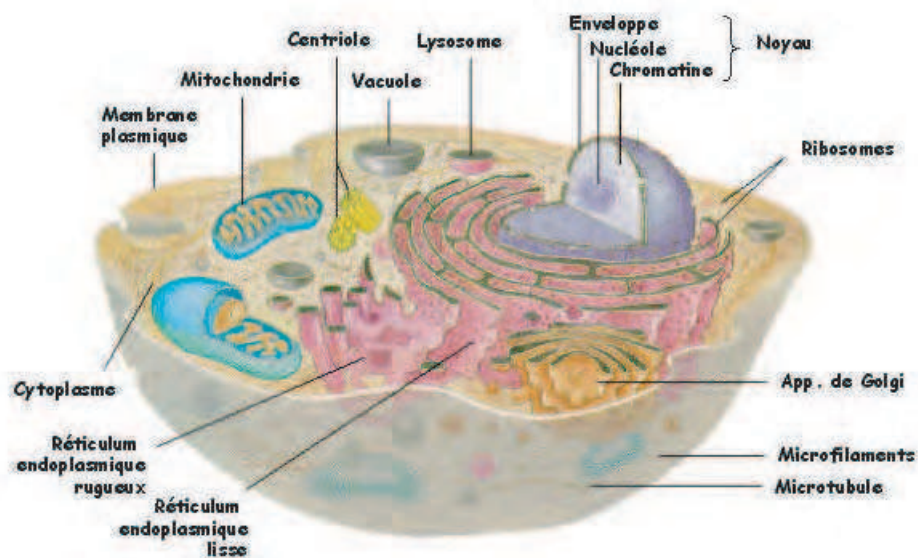


FIG. 1.1 – Représentation schématique d'une cellule. On distingue ses différents compartiments membranaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes etc.) ainsi que les principaux constituants : la membrane plasmique, le cytoplasme, les centrioles, les ribosomes, les microtubules, les microfilaments etc. D'après le cours de M. Le Marchand, université de Nantes.

Les cellules végétales contiennent en outre des organites spécifiques comme les chloroplastes. Tous ces compartiments baignent dans le cytoplasme, milieu contenu dans la cellule en dehors du noyau. Enfin, la cellule est délimitée par la membrane plasmique qui sert de frontière avec l'extérieur. Les organites sont reliés

par le réseau très dense du cytosquelette sur lequel le transport est possible, et qui donne également sa forme à la cellule. Celui-ci est constitué trois types de filaments protéiques qui sont : les microtubules¹ (MTs), les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Beaucoup de groupes de chercheurs ont participé à l'étude du trafic intracellulaire avec à leur tête, George Palade et Christian de Duve [Palade, 1975, Duve, 1975], qui ont les premiers fait le lien entre les différents compartiments cellulaires et leur fonction [Mellman and Warren, 2000].

A.2 Les voies d'endocytose et de biosynthèse-sécrétion

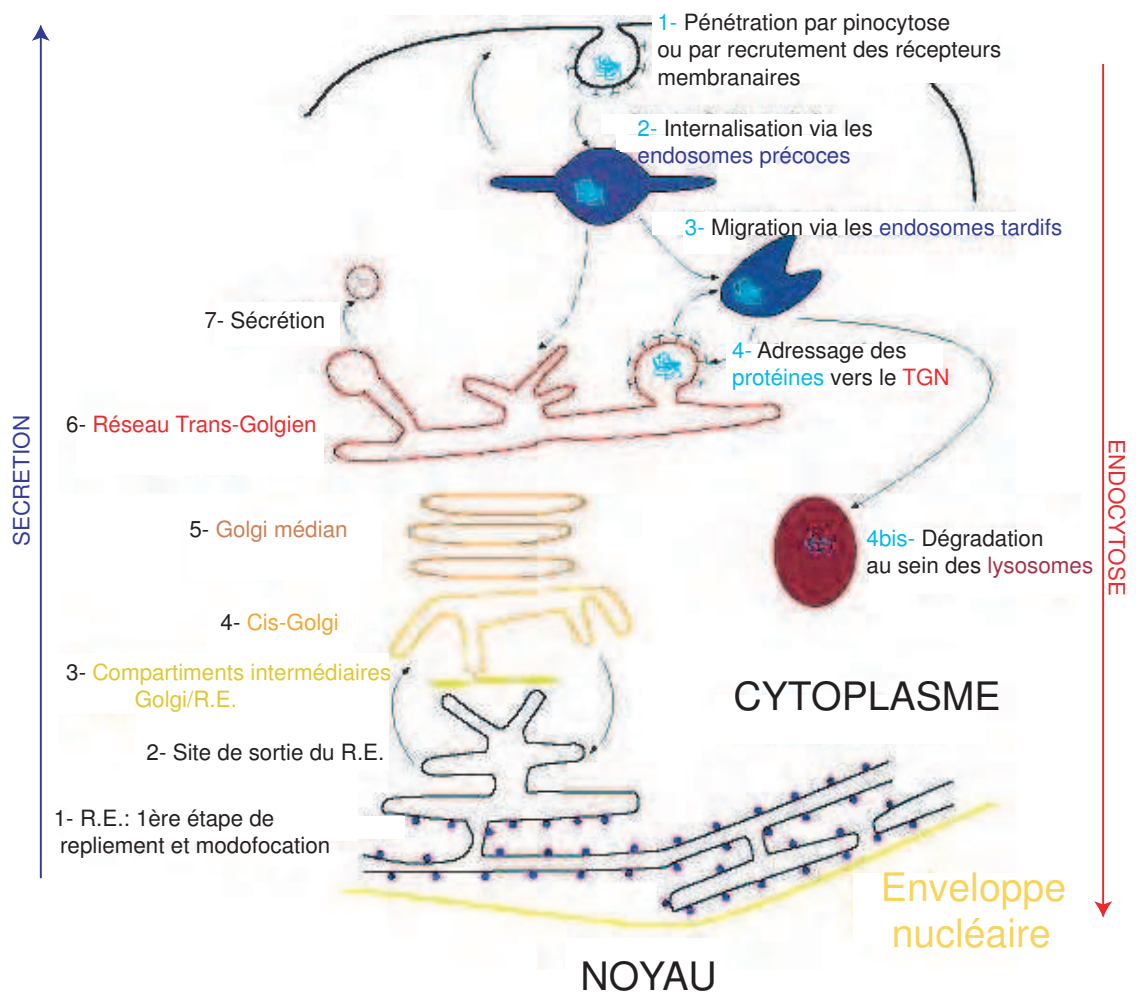


FIG. 1.2 – Représentation schématique des voies de transport (exocytose/endocytose) intracellulaire. Figure issue du site internet : virologie.free.fr/03-transport_intracell_prot/transport_intracell_prot.htm

✓ Endocytose

¹Une étude plus détaillée des MTs est présentée au chapitre 2 §A.1.

La cellule peut internaliser des molécules (petites ou grosses, baignées dans du fluide) par un processus appelé "endocytose". Ces molécules sont ensuite transportées dans le cytosol (cytoplasme moins les compartiments cellulaires) suivant les différentes étapes représentées figure 1.2.

La pénétration a lieu par pinocytose (les matériaux solubles sont ingérés à partir de l'environnement et incorporés dans des vésicules) ou par recrutement de récepteurs membranaires et de protéines qui contribuent à la déformation de la membrane (protéines de manteau). Les molécules sont internalisées via des endosomes précoces. A ce stade, tri et recyclage vers la membrane plasmique sont possibles. Les molécules qui continuent leur chemin dans la cellule migrent via des endosomes tardifs. Elles sont ensuite acheminées vers le réseau trans-golgien ou digérées par des enzymes présentes dans les lysosomes.

✓ *Exocytose/biosynthèse-sécrétion*

Les différents organites présentés précédemment permettent de distribuer en différents points de la cellule jusqu'à la membrane plasmique des glucides, des protéines nouvellement synthétisées et des lipides. Toutes ces molécules suivent les voies de biosynthèse-sécrétion représentées figure 1.2 et passent par de nombreux compartiments. Les protéines impliquées dans la "voie de sécrétion", par exemple, sont synthétisées grâce aux ribosomes au niveau du RE (1ère étape de repliement et de modification), puis sont transportées, via des compartiments intermédiaires, à travers les différentes citernes de l'appareil de Golgi (dans l'ordre du transport antérograde, cis-, médian et trans-Golgi) où elles subissent une nouvelle transformation. Certaines molécules sont renvoyées vers le RE par une voie de transport rétrograde [Sannerud et al., 2003], mais la plupart atteignent le TGN (trans-Golgi-network) d'où elles sont triées et, pour certaines d'entre elles, transportées jusqu'à la membrane plasmique. La cellule peut donc modifier les molécules par une série d'étapes contrôlées, les stocker jusqu'à ce qu'elle en ait besoin, puis les libérer au niveau de domaines spécifiques de la surface cellulaire par un processus appelé "exocytose". En outre, l'appareil de Golgi a un rôle central dans le trafic intracellulaire puisqu'il fait le lien entre les voies d'exocytose et d'endocytose. On peut remarquer enfin que ces voies relient des compartiments comportant une seule bicouche de membrane (donc sans mitochondrie). Une étude quantitative du trafic dans la voie de sécrétion (RE-Golgi-membrane plasmique) est présentée dans la revue [Lippincott-Schwartz et al., 2000] (voir fig. 1.3).

✓ *Modes de transport*

Il existe plusieurs modes de transport des différentes molécules qui sont acheminées dans la cellule ; ils consistent tous à passer les barrières énergétiques que constituent les membranes lipidiques. Celles-ci permettent de préserver l'intégrité de la cellule et de ses différents compartiments sans en modifier le contenu interne. Le mode de transport utilisé dépend bien sûr du type de molécules et de leur lieu de destination. En ce qui concerne par exemple les protéines, leur transport est différent selon que les protéines soient membranaires ou solubles. Elles sont ciblées grâce à un peptide signal dans leur séquence d'acide aminés qui est reconnu par des récepteurs protéiques

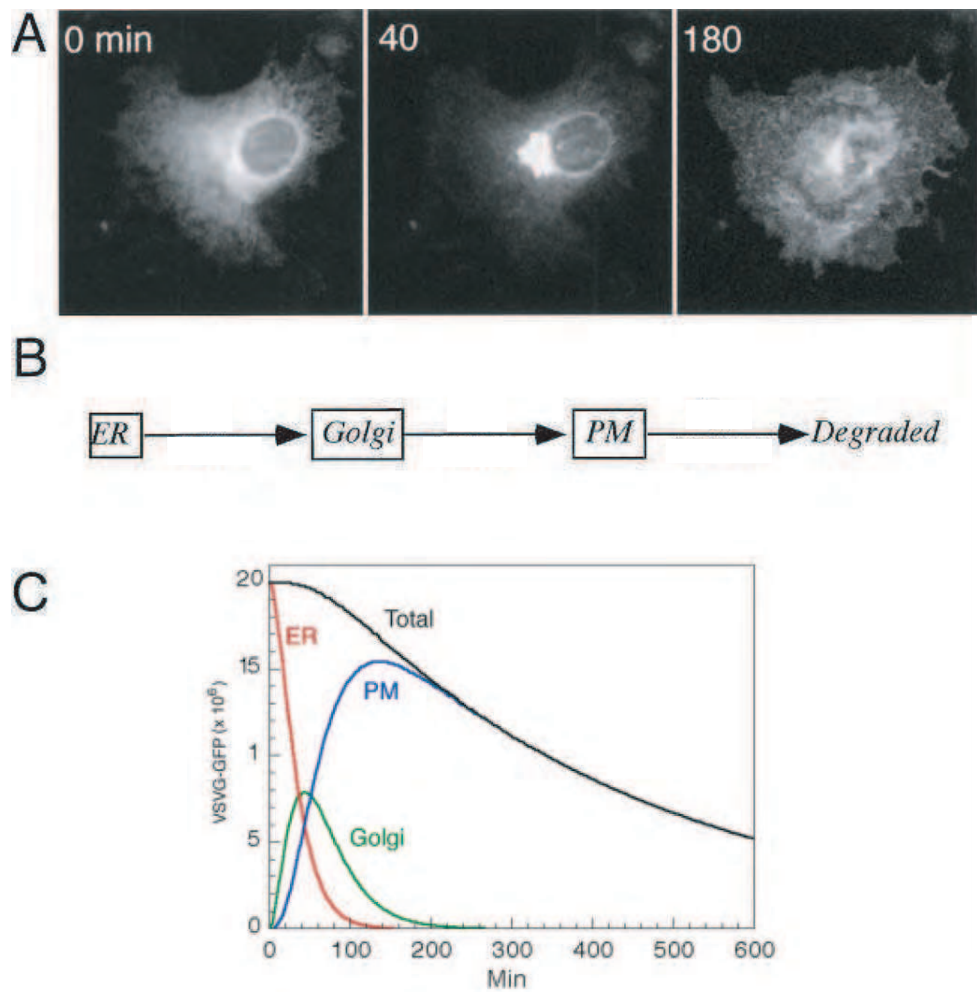


FIG. 1.3 – . (A) Transport de la protéine VSVG (Vesicular Stomatitis Virus G, protéine transmembranaire de virus exprimée par la cellule et dont la position dans la voie de sécrétion dépend de la température) marquée en fluorescence grâce à de la GFP (Green Fluorescence Protein) selon la voie de sécrétion lorsque la température est égale à 32°C . Le trafic est bloqué pour des températures de l'ordre de 40° , ce qui permet donc de le déclencher au moment de l'observation en vidéomicroscopie en abaissant la température de 40° à 32°C . On observe la distribution de VSVG-GFP au temps 0 (au niveau du RE), à 40 min (au niveau du Golgi) et à 180 minutes (au niveau de la membrane plasmique). (B) Schéma proposé pour le transport de VSVG-GFP dans les différents compartiments, avec les constantes cinétiques observées expérimentalement. (C) Variation de l'intensité de fluorescence des différents compartiments en fonction du temps (obtenus à partir de l'expérience (A)) à partir du moment où VSVG-GFP peut se déplacer dans la cellule. D'après [Hirschberg et al., 1998, Lippincott-Schwartz et al., 2000].

spécifiques situés sur les organites cibles. Sans peptide signal, les protéines restent dans le cytosol après leur synthèse [Alberts et al., 1995].

Toujours en ce qui concerne les protéines, le premier mode de transport possible consiste simplement à passer directement au travers de la membrane (après avoir été complètement dépliées) grâce à un complexe protéique formant un pore. Ce type de transport s'appelle la "translocation" et a surtout lieu au niveau de la membrane du RE, des mitochondries et des chloroplastes, ou des peroxyosomes. Le noyau contient aussi un ensemble de pores dits "nucléaires" qui fonctionnent comme des portes sélectives : elles permettent le transport spécifique de macromolécules et la diffusion libre de petites molécules.

Enfin, les protéines peuvent être transportées le long des voies d'endocytose et de biosynthèse-sécrétion par des intermédiaires de transport de type vésiculaire ou tubulaire, que nous allons plus détailler au paragraphe suivant. Je m'attarderai plus sur les tubes de membrane. En effet, l'essentiel de mon travail de thèse a consisté à mimer le comportement de ces intermédiaires de transport.

A.3 Les intermédiaires de transport

A.3.1 Forme vésiculaire

Les intermédiaires de transport de type vésiculaire ont été les premiers à avoir été vus grâce au développement des techniques d'observation comme la microscopie électronique dans les années 70 [Palade, 1975]. En effet, leur taille ne dépasse généralement pas les 100 nm (fig. 1.4).

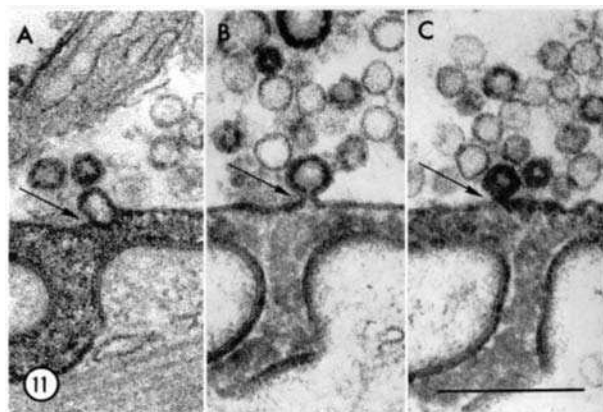


FIG. 1.4 – Formation d'une vésicule. Trois coupes différentes d'un neuro-muscle observées par microscopie électronique à grande puissance au niveau d'une zone active montrent les différentes étapes. (A) La vésicule a bourgeonné au niveau de la membrane. (B) La vésicule est encore maintenue par un très court lien. (C) Fission de la vésicule. Barre=0,25 μm ; X 140 000. D'après [Ceccarelli et al., 1972].

Le mécanisme généralement accepté pour la formation et le transport des vésicules est représenté figure 1.5 et comporte quatre étapes principales :

1. déformation et bourgeonnement ("budding") de l'organite émetteur
2. fission de la membrane, ce qui donne naissance à la vésicule
3. transport le long du cytosquelette
4. fusion avec l'organite "accepteur"

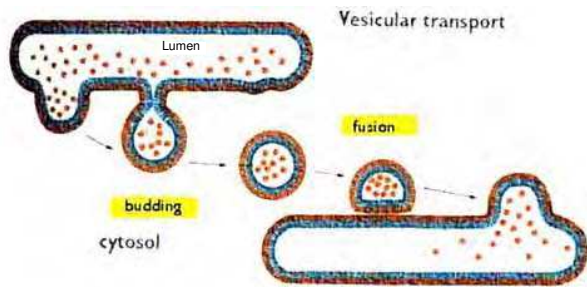


FIG. 1.5 – Les différentes étapes du transport vésiculaire : budding de l'organe émetteur, fission de la vésicule, transport puis fusion avec l'organe accepteur. D'après [Alberts et al., 1995].

Ce type de transfert de vésicules d'un organe à l'autre pose cependant la question du maintien de l'intégrité de ces organes au cours du temps. En effet, les membranes émettrices et acceptrices ont généralement des compositions biochimiques différentes. Le trafic de membranes entre elles serait donc une "invitation au désordre" (au bouleversement de leurs compositions respectives) s'il n'était pas associé dans le même temps à trois autres processus [Mellman and Warren, 2000] :

1. **le tri moléculaire** : les composants de la membrane sont sélectivement soit inclus soit exclus des vésicules de transport natives. Ainsi, seuls les composants qui sont sur le point d'être transportés ont besoin d'être triés dans la membrane de l'organe émetteur et ôtés de celui-ci.
2. **le ciblage des vésicules** : les vésicules de transport émises par l'organe donneur ont dès le départ une étiquette d'adressage qui leur permet d'interagir et de fusionner seulement avec l'organe accepteur approprié.
3. **la correction des erreurs** : les cargos qui ont été délivrés au mauvais endroit sont récupérés et réorientés vers la membrane donneuse.

Ces trois processus nécessitent un apport constant d'énergie, ce qui permet de maintenir les différences entre les compartiments et s'oppose au mélange dû à l'entropie.

A.3.2 Forme tubulaire

✓ Mise en évidence d'intermédiaires de transports tubulaires

Les premières images de tubes (50-100 nm) et réseaux de tubes de membrane au niveau des cis- et trans-Golgi datent de la fin des années 70 [Rambourg et al., 1979]. Elles ont été obtenues par microscopie électronique à haut voltage. C'est à ce moment que la controverse sur la forme des intermédiaires de transport a commencé. En effet, il est possible de penser que, comme l'imagerie par microscopie électronique utilise des sections très minces d'une cellule (de l'ordre de 60 nm), si ces sections coupent simplement un tube perpendiculairement à son axe, alors l'image obtenue a une forme d'anneau. Comme la probabilité de couper un tube dans le sens de sa longueur est très faible par rapport à celle de le couper plus ou moins perpendiculairement, la plupart du temps, les images montrent des anneaux dont la forme est souvent assimilée (de façon hâtive) à une vésicule. Il a fallu attendre les premières

reconstructions à trois dimensions pour avoir de vraies preuves de la présence d'intermédiaires de transport tubulaires *in vivo*, par exemple entre les citernes de l'appareil de Golgi [Rambourg and Clermont, 1990].

Par la suite, au début des années 90, il a été observé que le traitement de cellules vivantes avec de la Brefaldine A (BFA) inhibait complètement la formation d'intermédiaires de transport vésiculaires et modifiait profondément la structure et la fonction du Golgi, qui finissait par fusionner avec le RE (voir pour revue [Klausner et al., 1992]). Le phénomène le plus étonnant était l'apparition d'un large réseau de tubes de membrane partant du Golgi vers le RE, dont l'observation a permis de mettre en évidence le transport rétrograde entre ces compartiments [Lippincott-Schwartz et al., 1990]. Le même genre de phénomène de tubulation a été observé lorsque la concentration en ATP dans le cytosol était simplement diminuée [Cluett et al., 1993]. La conclusion de ces expériences est que la tubulation n'est en fait qu'une exagération du phénomène de "budding" (à l'origine de la formation des vésicules) lié à un dérèglement de la fixation des protéines de manteau (qui permettent le "budding").

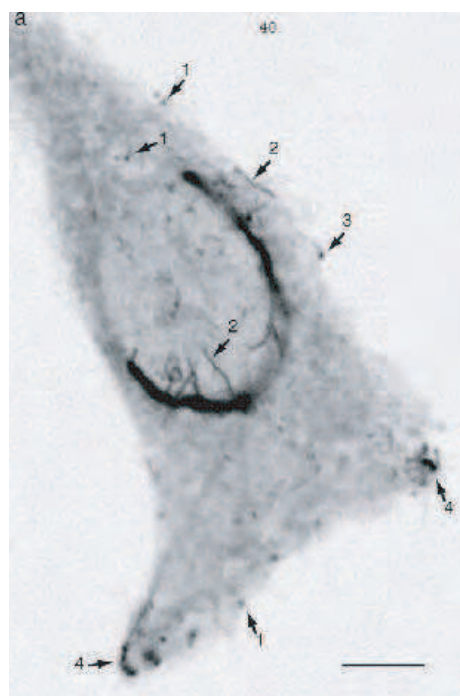


FIG. 1.6 – Transport de la protéine Rab6-GFP dans une cellule HeLa vivante. La grande accumulation centrale (en forme de croissant) correspond à l'appareil de Golgi. Des éléments représentatifs du trafic (1) globulaires et (2) tubulaires sont marqués par des flèches. Des régions distinctives d'accumulation Rab6-GFP sont aussi numérotées (3) pour une région de côté et (4) pour un coin. Image obtenue par microscopie confocale à balayage à 37°. Le contraste de l'image est inversé. Un film est aussi visible sur le site : www.jcb.org/cgi/content/full/147/4/743/DC1. Barre : 5 μm . D'après [White et al., 1999].

Des études plus récentes effectuées en utilisant la microscopie optique, toujours sur des cellules vivantes, ont montré que les intermédiaires de transport pouvaient aussi avoir une forme allongée (300-500 nm), voire tubulaire (de quelques microns) sans traitement particulier comme précédemment (à la BFA ou en diminuant l'ATP cytosolique) [Sciaky et al., 1997, Presley et al., 1998, White et al., 1999] (fig. 1.6). A un certain point, ces intermédiaires tubulaires étant observés à pratiquement toutes les étapes du transport, certains chercheurs avaient même avancé l'hypothèse que les intermédiaires de transport étaient tous tubulaires, et que les vésicules n'étaient que des produits de leur fission. Cependant, cet enthousiasme a été tempéré par l'obser-

vation que la surexpression même faible d'une protéine marquée à la GFP² impliquée dans le transport pouvait amplifier la formation de ces tubules [Nizak et al., 2003]. Néanmoins, des tubules ont aussi pu être observés dans des cellules non transfectées à la fois par microscopie de fluorescence et immuno-microscopie électronique [Klumperman et al., 1998].

Il semble maintenant acquis que ces structures tubulaires existent et ne sont pas des artéfacts, même si leur quantité et leur longueur peuvent dépendre des moyens utilisés pour les visualiser. Ces tubes peuvent correspondre à une étape intermédiaire avant la formation de vésicules. Cette hypothèse pourrait s'expliquer par des processus de déstabilisation des tubes (par "pearling" par exemple [Bar-Ziv and Moses, 1994]) donnant lieu à leur constriction et leur fission (fig. 1.7) [Corda et al., 2002], comme ce qui a déjà été observé sur des tubes de membrane *in vitro* [Roux et al., 2005a] et prévu théoriquement [Allain et al., 2004].

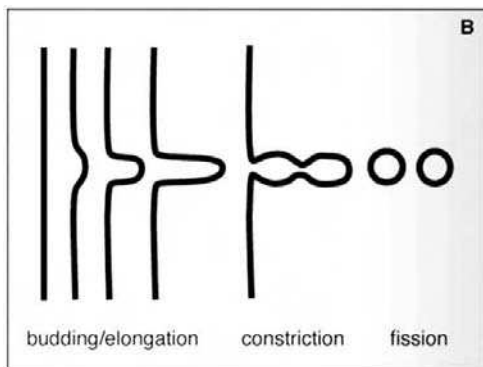


FIG. 1.7 – Représentation schématique des étapes menant à la formation d'intermédiaire de transport intracellulaire. Les petites vésicules sont générées à partir d'une membrane plate, qui peut s'allonger sous forme de tubules. Ceux-ci sont ensuite déstabilisés, ce qui conduit à leur constriction, et enfin coupés. D'après [Corda et al., 2002].

Un des avantages du transport tubulaire par rapport au transport vésiculaire est que le recrutement des protéines impliquées dans le budding, le tri et la signalisation (voir plus loin pour plus de détails) et leur régulation au niveau de l'interface MT-membrane n'a besoin de se faire qu'une fois pour un tube, au lieu de plusieurs fois pour chaque vésicule formée. Cela peut être utile pour le transport sur des longues distances [Stephens and Pepperkok, 2001].

✓ Réseaux de tubes de membrane dans un même compartiment

La formation de ces intermédiaires de transport tubulaires peut être mise en parallèle avec l'existence de réseaux de tubes de membrane au sein d'un même compartiment. En effet, des réseaux de tubes ont été observés dans le RE; des tubes reliant les différentes citernes de l'appareil de Golgi ont également été mis en évidence [Polishchuk et al., 2000]. Les tubes se construisent par un procédé dans lequel un tube de membrane est extrait d'un compartiment, s'étend puis fusionne dans une autre région du même compartiment [Terasaki et al., 1984, Lee and Chen, 1988, Cooper et al., 1990] (fig. 1.8). La formation et l'extension de tubes de membrane est donc fondamentale dans la fonction comme dans la maintenance de la structure des différents organites de la cellule.

²Green Fluorescent Protein, qui permet d'étudier une protéine particulière en vidéomicroscopie sans perturber l'environnement [Chalfie et al., 1994].

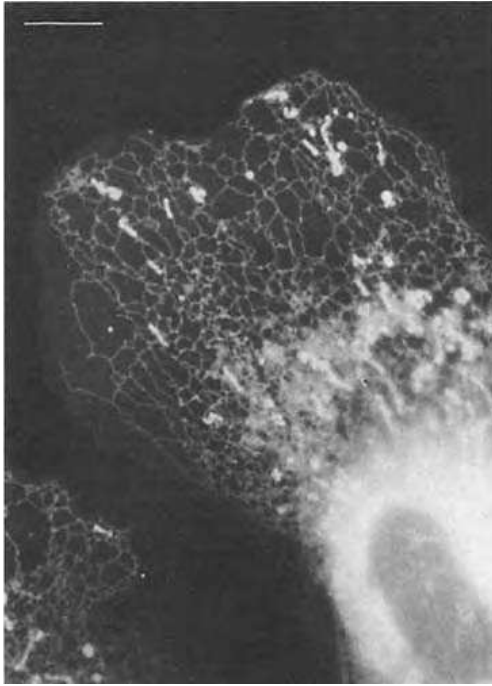


FIG. 1.8 – Distribution de Reticulum Endoplasmique dans un lamellipode d'une cellule CV-1. Les cellules sont fixées avec du DiOC6(3) qui est un marqueur du RE et observées en microscopie de fluorescence. On remarque que le RE forme un large réseau de tubes de membrane. Ces tubules de RE sont distribués exactement le long du réseau de MTs. La polymérisation de MTs individuels et l'extension de tubes de RE ont lieu en même temps, mais la dépolymérisation des MTs ne change pas le réseau de tubes de RE. Il a juste tendance à se rétracter vers le centre de la cellule. Barre=10 μm . D'après [Terasaki et al., 1986].

On peut remarquer finalement que l'existence de tubes de membrane *in vivo* ne s'arrête pas aux voies de transport intra-ou inter-organites du RE et du Golgi, mais a aussi été observé dans les mitochondries [Koshiba et al., 2004] ou bien entre des cellules vivantes [Rustom et al., 2004].

✓ Mécanisme de formation des tubes de membrane

La figure 1.8, présentant les travaux de Terasaki et al [Terasaki et al., 1986], montre que la structure même du RE est constituée de tubes de membrane. Ces tubes sont colocalisés avec le réseau de MTs présent dans la cellule : la croissance des tubes dépend de la polymérisation de MTs individuels mais la dépolymérisation des MTs ne détruit pas le réseau de tubes de membrane³. Il tend juste à se rétracter vers le centre de la cellule par un flux rétrograde qui peut être régulé par le complexe actine/ myosine [Waterman-Storer and Salmon, 1998]. Ainsi, les tubes de RE et les MTs sont hautement interdépendants. Plus récemment, grâce au développement des techniques d'observation, Waterman-Storer et Salmon [Waterman-Storer and Salmon, 1998] ont réussi à observer la dynamique de formation de ces tubes de membrane de RE. Ils ont trouvé qu'il existe essentiellement deux mécanismes qui interviennent (fig. 1.9) :

1. l'étirement le long d'un MT préexistant (stabilisé ou non).
2. l'attachement au bout d'un MT qui polymérise (extrémité "+"). Ce mécanisme appelé TAC (Tip Attachment Complexe [Waterman-Storer et al., 1995]) est bloqué lorsque les MTs sont stabilisés (c'est-à-dire arrêtent de croître).

³voir chap. 2 §A pour une description de la dynamique de croissance et décroissance des MTs par polymérisation et dépolymérisation de dimères de tubuline.

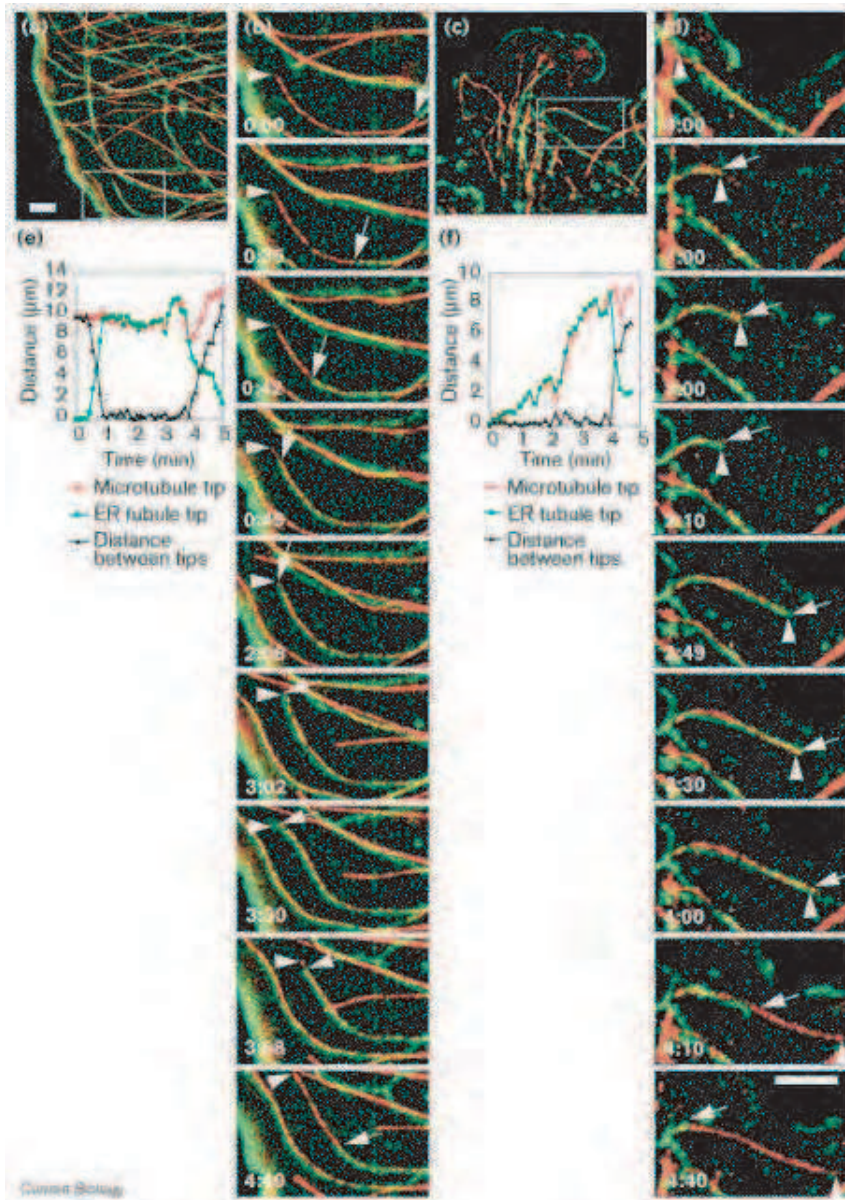


FIG. 1.9 – Extension de tubes de membrane de RE (verts marqué au $DiOC_6$) le long de MTs (rouges marqué à la rhodamine). (3). (a,c) Images montrant un large réseau de tubes, les encadrés correspondent aux zooms (b,d). (b) Mécanisme d'étirement d'un tube de membrane le long d'un MT. La flèche de gauche montre l'extrémité du MT. La flèche de droite montre l'avancement du tube. Lorsqu'il atteint l'extrémité, le tube se déplace avec le bout, puis se rétracte alors que le MT recommence à croître. (d) Mécanisme de TAC : on observe la croissance simultanée d'un tube de RE et d'un MT dont les extrémités sont marquées par des flèches. Le tube finit par se détacher (4 :10). (e,f) Position des bouts du tube, du MT et leur distance de séparation correspondant respectivement aux figures (b) et (d) représentées en fonction du temps. Barre= $5 \mu m$. D'après [Waterman-Storer and Salmon, 1998].

De plus, lorsque les MTs sont stabilisés (en utilisant du taxol par exemple), seul le premier mécanisme persiste. C'est ce mécanisme d'étirement de tubes de membrane le long de MTs stabilisés que nous avons été capable de reproduire *in vitro*.

On peut supposer que ces mécanismes de formation de tubes de membrane dans le cas du RE peuvent s'appliquer à l'ensemble des tubes de membrane MT-dépendants. La raison pour laquelle la cellule a eu besoin de développer deux mécanismes différents est encore inconnue, mais ces mécanismes pourraient avoir des fonctions différentes. Le TAC, par exemple, pourrait intervenir dans la régulation de la croissance des MTs. De plus, comme le mécanisme d'étirement, lorsqu'il a lieu vers l'extrémité "+" d'un MT, se transforme en TAC quand le tube a atteint le bout du MT (fig. 1.9), on peut penser que ces deux mécanismes font intervenir le même complexe de protéines. Une des protéines impliquées est probablement une kinésine (moteur moléculaire associé aux MTs⁴), mais étant donnée la vitesse de croissance des tubes dans le cas du RE (de l'ordre de 60 $\mu\text{m/s}$), on peut penser que ce n'est pas une kinésine conventionnelle. Les composants moléculaires impliqués dans la formation et la croissance des tubes, ainsi que ceux impliqués dans le tri moléculaire, le ciblage et la signalisation vont être détaillés dans le paragraphe suivant.

A.4 Les principaux composants moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire

[Farsad and Camilli, 2003] ont passé en revue les mécanismes de déformation de la membrane, ainsi que les possibles composants impliqués. Nous avons vu qu'il y avait quatre grandes étapes dans le transport de membrane entre organites : la déformation de la membrane et le tri des éléments à transporter, la fission des intermédiaires de transport, leur transport jusqu'à l'endroit ciblé et la fusion avec la membrane acceptrice. La partie suivante va détailler les différents composants impliqués dans ces processus. Le trafic cellulaire est un énorme domaine de la recherche en biologie cellulaire actuellement. Je ne serai donc pas exhaustive dans cette partie. Je présenterai les composants les plus importants qui ont été identifiés, mais je m'attacherai plus particulièrement à décrire ceux impliqués dans un transport d'un organite à l'autre, car c'est ce qui constitue le centre de ma thèse.

A.4.1 Formation et fusion des intermédiaires de transport

✓ *Composants impliqués dans la déformation des membranes et dans le tri moléculaire*

Un certain nombre de protéines qui contribuent à la déformation des membranes et à la formation de "bourgeons" ont été identifiées. Elles sont appelées "protéines de manteau" (coat proteins) car elles s'associent sur la membrane (comme un manteau) en formant des assemblages bidimensionnels qui la déforment. Suivant les organites im-

⁴voir chap.2 §B pour une description plus précise de la famille des kinésines.

pliés dans le trafic, les protéines de manteau diffèrent [Schekman and Orci, 1996] (fig. 1.10). Dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion (RE-Golgi), ce sont les protéines de type **COP** qui interviennent : COP-II intervient dans le transport antérograde entre le RE et les compartiments intermédiaires Golgi/RE [Barlowe et al., 1994] alors que COP-I intervient dans le transport intra-golgien ou rétrograde Golgi-RE [Oprins et al., 1993, Presley et al., 2002] (voir pour revue [Murshid and Presley, 2004]). Le recrutement des ces protéines de manteau sur la membrane est régulé par les GTPases appelées Sar1 pour COP-II et Arf1 pour COP-I [Springer et al., 1999]. Le transport de vésicules par la voie d'endocytose (de la membrane plasmique aux endosomes et au TGN) fait intervenir une deuxième sorte de manteau appelé les **clathrines** [Goldstein et al., 1979], qui jouent aussi un rôle au niveau du TGN. L'activité des clathrines nécessite la présence de protéines adaptatrices sur la membrane (les AP, Adaptator Protein Complex : AP1 pour les vésicules dérivées du TGN et AP2 pour les vésicules dérivées de la membrane plasmique) (voir pour revue [Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003]). La régulation du recrutement de ces clathrines fait aussi intervenir Arf dans le cas d'AP1 et la dynamine dans le cas d'AP2. On peut citer finalement une dernière structure qui prend part à la déformation de la membrane et qui est constituée de **cavéolines**. Ces protéines polymérisent à la surface des membranes pour former des caveolae (qui sont aussi des sortes de "bourgeons"), et sont impliquées dans certaines voies d'endocytose [Conner and Schmid, 2003]. D'autre part, il a été montré qu'il existe une autre voie de transport Golgi-RE indépendante des protéines COP [Echard et al., 1998, White et al., 1999]. C'est justement le long de cette voie que des intermédiaires de transport tubulaires ont été observés. Le rôle des protéines de manteau dans l'ensemble des étapes de formation des intermédiaires de transport, et notamment les tubes de membrane, n'est donc pas complètement compris.

Un gros travail est encore nécessaire pour déterminer exactement les processus de tri. Il a lieu par exemple lorsque le composant qui doit être transporté ne peut interagir qu'avec une seule des protéines de manteau, ou bien lorsqu'il est retenu dans la membrane par un intra-organite ou par la matrice du cytoplasme, ou enfin quand les composants mal triés sont récupérés au niveau de la membrane acceptrice et réexpédiés vers la membrane de départ [Alberts et al., 2002]. Il est maintenant clair que ces processus impliquent aussi des lipides particuliers appelés phosphoinositides, notamment au niveau de l'appareil de Golgi [Martin, 2001, Matteis et al., 2002]. Il a aussi été montré que la composition de la membrane, et plus particulièrement la formation de microdomaines de lipides ("lipid rafts"), joue un rôle important dans le tri des lipides et des protéines dans la membrane [Simons and VanMeer, 1988] (pour revue [VanMeer and Sprong, 2004]). Le tri peut avoir lieu au moment du bourgeonnement de microdomaines pré-existants dans la membrane et issus de séparations de phases lipidiques⁵, ou bien être effectué au moment même de la formation du bourgeon par piégeage sélectif des composants à trier [van Meer and Lisman, 2002]. Les lipides présents, qui confèrent à la membrane ses propriétés physiques, peuvent aussi jouer un rôle dans le bourgeonnement en jouant sur la courbure de la

⁵Voir ch.2§C.1.3 pour plus de détails.

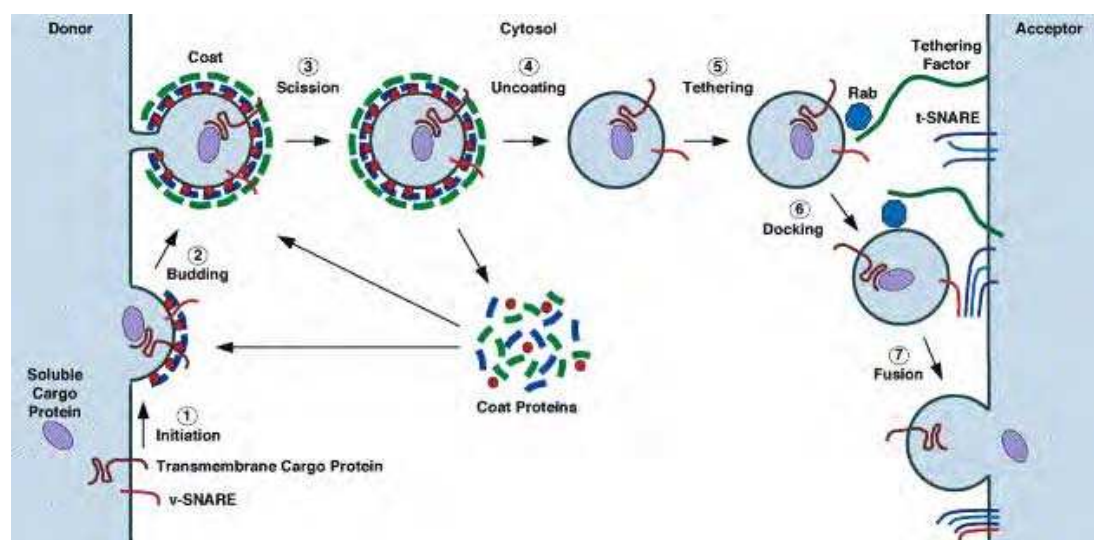


FIG. 1.10 – Schéma proposé pour les différentes étapes du bourgeonnement à la fusion de vésicules de transport. (1) Initiation de l'assemblage des manteaux. Les protéines de manteau (en bleu) sont recrutées au niveau de la membrane du compartiment émetteur en s'attachant par l'intermédiaire de protéines type GTPase (en rouge) associées à la membrane et/ou de phosphoinositides. Les protéines transmembranaires cargo et les SNAREs sont recrutées au niveau des manteaux. (2) Bourgeonnement. Les protéines de manteau (en vert) s'assemblent et la courbure augmente. (3) Fission. Le cou entre la vésicule et le compartiment émetteur est serré soit directement par les protéines de manteau, soit par des protéines dites "accessoires", ce qui conduit au détachement. (4) Départ des manteaux. La vésicule perd son manteau à cause de différents événements comme l'inactivation de petites GTPases, l'hydrolyse de phosphoinositides, et l'action d'enzymes impliquées dans le départ des manteaux. Les protéines de manteau cytosoliques sont alors recyclées. (5) Transport et accrochage. La vésicule "nue" (sans manteau) se déplace vers le compartiment accepteur, probablement guidée par le cytosquelette, et s'accroche grâce à la combinaison d'une Rab-GTP et d'un facteur d'accostage. (6) Rapprochement. Les v- et t-SNAREs s'assemblent en un faisceau de quatre hélices. (7) Ce "complexe trans-SNARE" favorise la fusion de la vésicule avec la bicouche du compartiment accepteur. Le cargo est transféré et les SNAREs sont recyclées. D'après [Bonifacino and Glick, 2004]

membrane. Ce mécanisme plus physique, qui peut aussi jouer un rôle dans le tri des lipides [Roux et al., 2005a], est probablement couplé aux mécanismes moléculaires présentés avant [Sprong et al., 2001].

✓ *Composants impliqués dans la fission des intermédiaires de transport*

Une fois la membrane déformée et le "bourgeon" créé, l'intermédiaire de transport doit se détacher de la membrane émettrice, ce qui passe par une étape de fission de la membrane. Le rôle des protéines de manteau dans cette étape

est encore mal connu, puisqu'il a été montré que leur présence n'est pas toujours nécessaire à la fission [McNiven, 1998]. Cependant, d'autres protéines impliquées ont été identifiées, comme par exemple la dynamine et l'endophiline [Schmidt et al., 1999, Kreitzer et al., 2000] qui sont présentes dans la voie d'endocytose, mais qui pourraient aussi jouer un rôle dans la fission au niveau du Golgi [Cao et al., 2000, Farsad et al., 2001]. Au niveau du Golgi, plusieurs autres protéines ont été mises en évidence : CtBP/BARS [Weigert et al., 1999], la phospholipase D [Ktistakis et al., 1996], les protéines kinases C et D [Simon et al., 1996, Jamora et al., 1999], une PITP (PhosphoInositol Transfer Protein) [Simon et al., 1998]. Cependant, on ne sait pas encore si ces protéines agissent à des endroits différents du Golgi ou au contraire agissent de façon coordonnée. Ce qui est sûr, c'est que toutes ces protéines ont besoin de lipides pour pouvoir fonctionner. En effet, dans certains cas, ces protéines impliquées dans la fission interagissent avec des microdomaines enrichis en acide lysophosphatidique (LPA), acide phosphatidique (PA) et en diacylglycerol (DAG), qui peuvent faciliter la formation d'intermédiaires de fission avec une très grande courbure par une rapide interconversion entre ces trois espèces (voir pour revue [Corda et al., 2002]). Le couplage entre la dynamique des lipides et les fonctions spécifiques des protéines impliquées dans la fission reste mal connu mais est probablement la clé pour comprendre les mécanismes de fission. Cette étape de fission est probablement la moins comprise dans tout le transport de membrane intracellulaire. On peut penser que tous les composants n'ont probablement pas été découverts puisque ceux qui sont connus actuellement ne semblent pas suffire à décrire complètement les mécanismes de fission de la membrane observés *in vivo*, ou il faut envisager de nouveaux couplages de ces molécules avec d'autres déjà connues.

✓ *Composants impliqués dans le ciblage et la fusion des intermédiaires de transport*
Une fois les intermédiaires de transport formés, il faut les diriger vers leur destination. Les étiquettes d'adressage présentes sur les intermédiaires de transport ainsi que sur la membrane acceptrice qui ont été découvertes jusqu'à maintenant contiennent des protéines de la famille des **SNARE** [Pfeffer, 1999], qui interagissent de façon spécifique avec la membrane acceptrice (v-SNARE sur la vésicule/t-SNARE sur la membrane acceptrice) [McNew et al., 2000], et des "ras-like GTPases" de la famille des **Rab** [Novick and Zerial, 1997], qui aident à l'accrochage spécifique des vésicules. D'autres protéines peuvent aussi être impliquées dans l'accostage de la vésicule à la membrane acceptrice (comme par exemple la giantine ou p115 [Pfeffer, 1999]). Les complexes SNAREs interviennent clairement dans la fusion [McNew et al., 2000], mais les détails de ce mécanisme sont encore très débattus. L'ensemble des processus d'accostage et de fusion de la vésicule avec la membrane acceptrice à la base du ciblage est représenté figure 1.10. Il est possible que ces étapes fassent intervenir également des phosphoinositides dans la membrane [Roth, 2004b].

L'état actuel des connaissances sur les protéines qui jouent un rôle dans la formation, la fission et la fusion des vésicules de transport est développé par exemple

dans les revues [Bonifacino and Glick, 2004, Lee et al., 2004] et représenté figure 1.10. Les différents mécanismes de fusion et fission sont présentés dans la revue [Burger, 2000]. Les composants impliqués dans ces mécanismes ont été découverts grâce à des analyses génétiques et biochimiques du transport. L'amélioration de ces techniques permet chaque année d'isoler de nouveaux composants impliqués (par exemple en ce qui concerne les protéines de manteau [Roth, 2004a]). C'est pourquoi, de nombreux mécanismes proposés restent hypothétiques puisqu'on ne peut jamais être sûr d'avoir tenu compte de tous les composants importants, certains d'entre eux pouvant ne pas avoir encore été isolés. De plus, une approche purement moléculaire peut être insuffisante pour comprendre ces mécanismes. Étant donnée la grande complexité des intervenants, l'intérêt d'une reconstitution *in vitro* des mécanismes moléculaires proposés. Cette approche complémentaire permettrait en effet de déterminer quels sont les composants nécessaires et suffisants au mécanisme postulé (par exemple pour le "budding") et de mettre en évidence des effets de coopérativité qu'on ne peut déceler par une approche biochimique ou génétique.

A.4.2 Déplacement des intermédiaires de transport

✓ *Les microtubules*

Nous avons vu au paragraphe A.3.2 que les MTs jouaient un rôle important dans l'organisation du RE puisque les réseaux de tubes de membrane et de MTs étaient largement interdépendants. Ils jouent aussi un rôle dans l'organisation de l'appareil de Golgi puisque s'ils sont dépolymérisés (en présence de nocodazole), le Golgi "se fragmente" [Cole et al., 1996] (fig. 1.11). Enfin, ils régissent aussi la dynamique d'autres organites comme les endosomes précoces [Hopkins et al., 1990] et les lysosomes [Swanson et al., 1987]. En présence de BFA, ces organites forment des tubules le long du réseau de MTs de façon réversible [Lippincott-Schwartz et al., 1991, Wood et al., 1991], ce qui a permis de montrer que les MTs servaient de rails pour le trafic entre ces différents organites (pour revue [Cole and Lippincott-Schwartz, 1995]). En effet, on a du mal à imaginer que les intermédiaires de transport, qui, comme cela a été mentionné au paragraphe précédent, ont un système de tri et de ciblage très complexe, se déplacent simplement par diffusion dans le cytosol. L'étape de "déplacement" de ces intermédiaires deviendrait alors complètement inefficace (et désordonnée) en comparaison avec les étapes de "formation et de fusion".

✓ *Les moteurs moléculaires*

Étant donné que les intermédiaires de transport se déplacent le long des microtubules, il était tout à fait raisonnable de penser que les moteurs moléculaires associés aux MTs étaient impliqués dans ce transport [Vale, 1987]. Ainsi, il a été montré que les kinésines étaient impliquées dans le transport rétrograde de membrane du Golgi vers le RE grâce à des études faites à la fois en immunofluorescence et en microscopie électronique [Lippincott-Schwartz et al., 1995]. L'introduction d'un inhibiteur de la kinésine bloque en effet le transport du Golgi vers le RE, qui s'effectue vers l'extré-

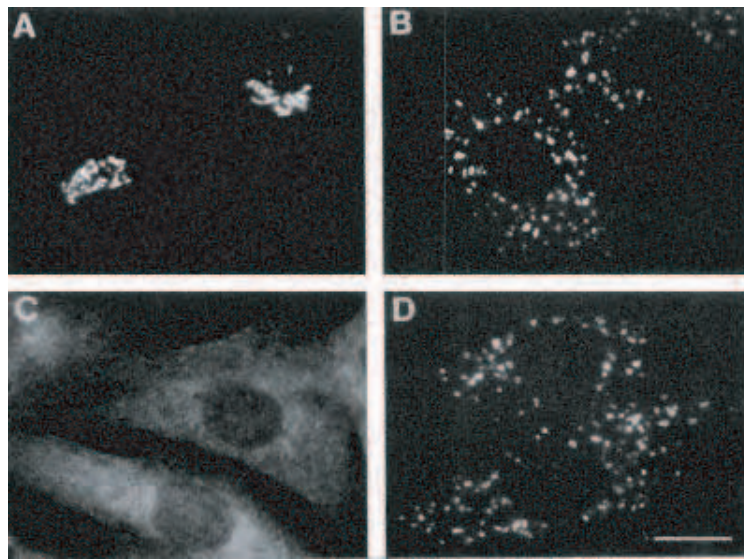


FIG. 1.11 – (A) La membrane du Golgi s’organise en citernes au centre de la cellule sans traitement au nocodazole. (B) En présence de nocodazole, le Golgi se fragmente et les fragments se retrouvent adjacents au RE. (C) Traitement à la BFA puis au nocodazole (D). Barre=10 μm . D’après [Cole et al., 1996].

mité ”+” des MTs, mais pas le transport du RE vers le Golgi. Ce dernier doit donc faire intervenir une autre classe de moteurs moléculaires qui marchent vers l’extrémité ”-”. En effet, le centre d’organisation des MTs (MTOC), là où ils sont nucléés (extrémité ”-”), se situe près de l’appareil de Golgi (fig. 1.12, voir aussi la photo figure 1.13(A)) dans la plupart des cellules de mammifères. Les MTs s’étendent donc du centre (”-”) vers le RE et la périphérie de la cellule, où se situent les extrémités ”+”.

Le transport du RE vers le Golgi (vers l’extrémité ”-” des MTs) est assuré par des dynéines cytoplasmiques [Paschal and Vallee, 1987] (fig. 1.12). Les dynéines sont bien des moteurs qui avancent vers l’extrémité ”-” des MTs. Le transport n’a pourtant lieu que lorsque la dynéine forme un complexe avec la dynactine [Gill et al., 1991]. Ce transport a pu être observé par différents groupes : [Presley et al., 1997, Burkhardt et al., 1997, Harada et al., 1998]. Il a aussi été montré que les intermédiaires de transport portent des kinésines dont l’activité est bloquée lors du transport RE-Golgi par les protéines de manteau COP-I, impliquées dans le transport antérograde [Lippincott-Schwartz et al., 1995]. Le mouvement des kinésines lors de ce transport antérograde a d’ailleurs pu être réactivé *in vitro* [Lane and Allan, 1999] (pour revue [Allan and Schroer, 1999]).

Le transport à longue distance Golgi-membrane plasmique (vers l’extrémité ”+” des MTs) fait aussi intervenir des kinésines [Kreitzer et al., 2000]. La formation des intermédiaires de transport a été étudiée en détail dans [Polishchuk et al., 2003]. Les auteurs ont montré que leur formation ne dépendait ni de la concentration en cargos, ni du recrutement de protéines de manteau à la surface de la membrane qui va

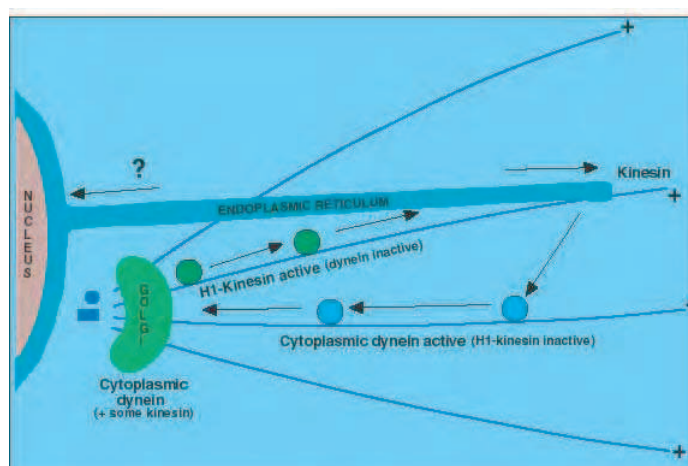


FIG. 1.12 – Organisation des voies de sécrétion précoce dans une cellule somatique animale. Le transport Golgi-RE est effectué par des kinésines (les dynéines présentes aussi sur le cargo sont inactives) alors que le transport RE-Golgi est effectué par des dynéines cytoplasmiques (les kinésines sont inactives). On remarque la position MTOC entre le noyau et le Golgi. Figure issue du site internet du groupe de Vicki Allan.

bourgeonner. **Les intermédiaires de transport sont simplement extraits de la membrane et tirés par les moteurs moléculaires.** Les auteurs ont notamment réussi à observer la présence de kinésines le long et au bout d'un tube de membrane en train d'être tiré (fig 1.13 (D)). Cette observation *in vivo* pourra ensuite être comparée avec nos observations *in vitro* sur la distribution des moteurs moléculaires qui tirent un tube de membrane à partir de vésicules géantes et qui s'accumulent au bout du tube (voir chapitre 5).

Enfin, il a été montré que d'autres moteurs moléculaires comme les myosines [Stow and Heinmann, 1998, DePina and Langford, 1999] et la dynamine (qui n'est pas un moteur conventionnel puisqu'il n'avance pas le long de filaments du cytosquelette, mais il utilise l'énergie obtenue par l'hydrolyse de nucléotides pour effectuer un changement de conformation) [Kreitzer et al., 2000] participaient au trafic de membranes dans la cellule, mais leur rôle exact est moins clair que celui des kinésines ou des dynéines et doit encore être déterminé (pour revue [Allan et al., 2002]).

✓ *Accrochage des moteurs aux membranes*

La famille des kinésines est très étendue⁶ [Hirokawa, 1998]. L'utilisation d'anticorps anti-kinésine comme le H1 [Lippincott-Schwartz et al., 1995] ne permet pas de déterminer de façon précise quel membre de la famille est impliqué [Hirokawa et al., 1989]. Cependant, le développement des techniques de marquage, de génétique et d'observation a permis de mettre en évidence un grand nombre de moteurs moléculaires

⁶voir ch.2 §B pour une étude plus détaillée des kinésines

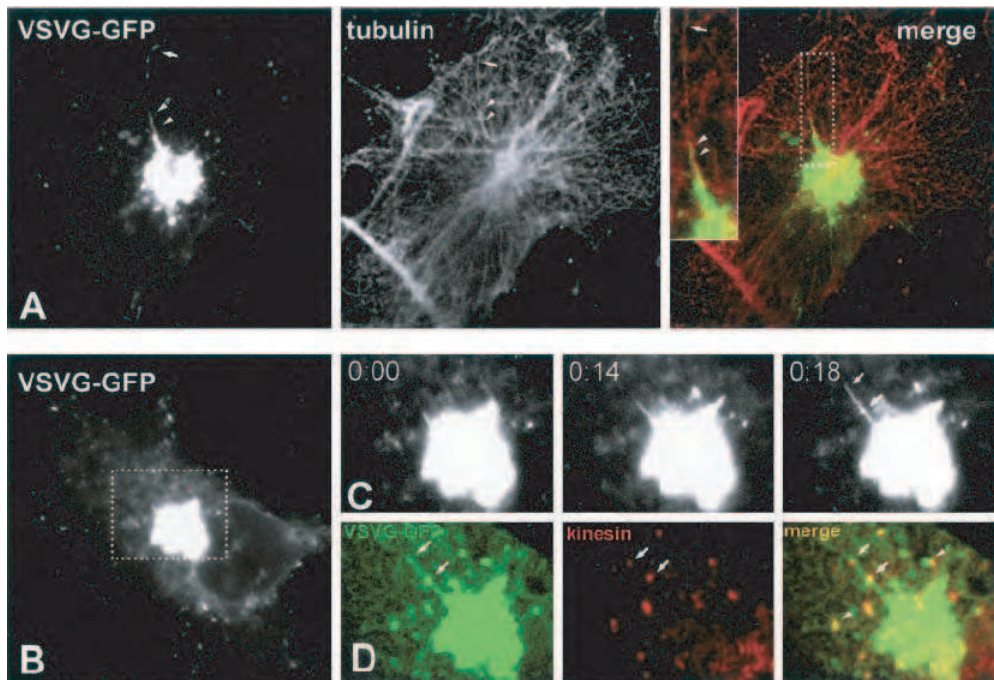


FIG. 1.13 – (A) Colocalisation entre la protéine de virus VSVG-GFP (vert) marquant le Golgi avec le réseau de MTs révélé après fixation par des anticorps (rouge) dans une cellule Cos7. On observe la présence de tubes de Golgi. L'image superposée montre bien que le Golgi est proche du MTOC et que les tubes tirés sont alignés avec des MTs. (B) Observation en microscopie de fluorescence d'une cellule transfectée avec VSVG-GFP. (C) Zoom de l'encadré en pointillé dans (B). Séquence d'images montrant la formation d'un tube de membrane à partir du Golgi, la vitesse de croissance est de l'ordre de $0,1 \mu\text{m/s}$. (D) Même intermédiaire de transport qu'en (C) fixé et traité avec de l'anti-kinésine (H1). On observe une concentration plus importante de kinésines au niveau du bout du tube (tête de flèche) et au niveau d'intermédiaires de transport libres (flèches). Barre= $7 \mu\text{m}$ (A-B); $4,3 \mu\text{m}$ (C-D). D'après [Polishchuk et al., 2003].

impliqués dans le trafic intracellulaire. La diversité des moteurs ainsi que la façon dont ils s'accrochent à la membrane et leur interaction avec les composants impliqués dans le tri, le bourgeonnement et le ciblage montre qu'il est impossible de découpler le trafic de membrane du trafic des moteurs moléculaires. Par exemple, il a été montré que AP1, qui coordonne la formation de vésicules à la surface du Golgi (pour revue [Kirchhausen, 2002]), interagit aussi avec la queue d'au moins une kinésine : KIF13A [Nakagawa et al., 2000].

Des études récentes ont de plus permis d'élucider certains modes de liaison des moteurs avec la membrane. En ce qui concerne les kinésines, il existe une grande variété de **protéines ("kinesin-cargo-linkers") qui font le lien entre la membrane et la kinésine**. Ce sont des protéines adaptatrices ou bien d'échafaudage ("scaffold"). Étant donné le grand nombre de sites d'accrochages présents à la fois

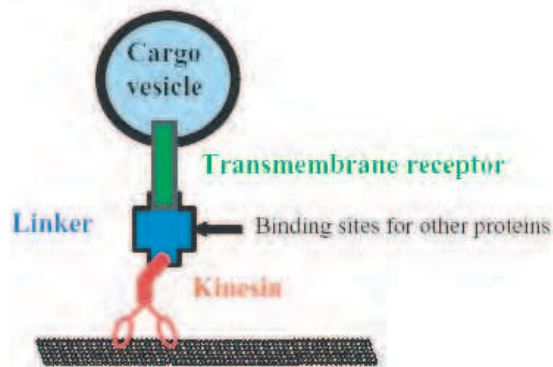
sur les kinésines, sur les liens et sur la membrane, le nombre de possibilités d'association est immense. On peut penser que ces associations jouent un rôle dans la signalisation, en plus du transport des cargos (fig. 1.14). Cette hypothèse a d'ailleurs été testée sur plusieurs exemples (voir pour revue [Schnapp, 2003]). Le fait que les protéines qui font le lien entre la kinésine et la membrane ont d'autres sites d'accrochage pour d'autres moteurs moléculaires laisse penser qu'il existe une coordination entre les différents moteurs qui sont accrochés sur un même cargo, ce qui peut servir notamment dans le choix de la voie à prendre ainsi que dans la régulation de l'activité de ces moteurs [Schnapp, 2003].

D'autres liens entre la kinésine et la membrane ont été découverts. Par exemple, il peut exister **un lien direct entre certains lipides présents dans la membrane** et un des membres de la famille Unc104/KIF1 [Klopfenstein et al., 2002]. Les lipides impliqués sont des phosphoinositides qui ont déjà été mentionnés pour leur rôle dans le tri et/ou le ciblage des cargos plus haut (§A.4.1). Il a été montré que les moteurs se préassemblent dans des domaines riches en phosphoinositides, ce qui active leur activité dans le transport. D'autres moteurs comme certaines myosines peuvent aussi se lier directement à la membrane [Tang et al., 2002].

La kinésine peut aussi se **lier au récepteur membranaire** placé sur le cargo qu'elle doit transporter ; ce qui est le cas dans les neurones avec le récepteur APP (Amuloid Precursor Protein) [Kamal et al., 2000] (fig. 1.14). Un récepteur membranaire connu pour la kinésine-1 (conventionnelle, voir la nouvelle nomenclature dans [Lawrence et al., 2004]) est la kinectine [Toyoshima et al., 1992] (voir pour revue [Burkhardt, 1996]). Il est possible que ce récepteur forme un complexe avec la kinésine et la dynéine cytoplasmique [Vallee and Sheetz, 1996] (voir pour revue [Lane and Allan, 1998]), ce qui est en accord avec ce que nous savons sur la présence des deux types de moteurs dans le transport le long des voies de sécrétion précoces dans la figure 1.12. Il a aussi été démontré que les kinésines pouvaient se lier aux protéines Rab, de même que certaines dynéines et myosines (voir pour revue [J.A. Hammer and Wu, 2002]). L'interaction entre le récepteur transmembranaire et la kinésine peut se faire à la fois au niveau des chaînes légères et/ou de la queue des kinésines (voir ch.2 §B.1.2, la structure de la kinésine) ou bien de façon coopérative entre les deux (voir pour revue [Schliwa and Woehlke, 2003, Wozniak et al., 2004]). Cependant, le mécanisme de cette coopération reste inconnu. En ce qui concerne la dynéine, nous savons que l'accrochage peut se faire via un complexe contenant la dynactine et la spectrine [Holleran et al., 1998, Muresan et al., 2001] ou bien de façon directe avec une protéine membranaire : la rhodopsine [Tai et al., 1999].

Un résumé des différents moyens d'accrochage des moteurs moléculaires sur la membrane est représenté figure 1.15 (voir pour revues [Klopfenstein et al., 2000] et [Schliwa and Woehlke, 2003]).

Des études récentes ont montré de plus qu'il existe plusieurs liens entre les systèmes de transport liés aux MTs et ceux liés à l'actine [Kuriyama et al., 2002], grâce notamment à des complexes qui se trouvent à l'extrémité "+" des microtubules [Lantz and Miller, 1998], contenant par exemple CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein) [Rickard and Kreis, 1996, Perez et al., 1999] ou bien des MAPs (MT



| Cargo | Trafficking pathway | Motor | Linker | Transmembrane receptor |
|---|-------------------------|-----------|------------------|------------------------|
| Mannose-6P receptor <small>(Nakagawa et al., 2000)</small> | Trans Golgi to endosome | KIF13A | AP-1 | Mannose-6P receptor |
| AMPA GluR complex <small>(Lee et al., 2002)</small> | Dendrites | KIF1A | Liprin- α | GRIP-AMPA GluR |
| Presynaptic components <small>(Lee et al., 2002)</small> | Axons | KIF1A | Liprin- α | LAR |
| Dlg scaffold complex <small>(Asaba et al., 2003)</small> | ? | KIF13b | Dlg | ? |
| NMDA GluR complex <small>(Setou et al., 2000)</small> | Dendrites | KIF17 | LIN complex | NMDA GluR |
| JNK signaling cascade <small>(Verhey et al., 2001)</small> | Axons | Kinesin I | JIP | ApoER2 |
| AMPA GluR complex <small>(Setou et al., 2002)</small> | Dendrites | Kinesin I | GRIP | AMPA GluR |
| APP <small>(Kamal et al., 2000)</small> | Axons | Kinesin I | — | APP |

FIG. 1.14 – Un des moyens d'accrochage de la kinésine sur une vésicule cargo utilise un lien entre la kinésine et une protéine transmembranaire (excepté dans le cas d'APP). Le tableau rassemble les derniers exemples recensés de ces mécanismes (voir [Nakagawa et al., 2000, Lee et al., 2003, Asaba et al., 2003, Setou et al., 2000, Verhey et al., 2001, Setou et al., 2002, Kamal et al., 2000]). La protéine qui fait le lien peut avoir d'autres sites d'accrochage pour d'autres moteurs. Une grande partie des liens découverts sont des protéines d'échafaudage ("scaffold") qui interviennent dans la signalisation des cargos ; ce sont des interactions protéine-protéine qui gouvernent. D'après [Schnapp, 2003].

Associated Proteins), ou encore des CLIMPs (Cytoskeleton-Linking Membrane Proteins) suivant le type de cargos ou de transport [Klopfenstein et al., 1998].

Les différents types de moteurs moléculaires jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire ; ils ne font pas que transporter les intermédiaires de trans-

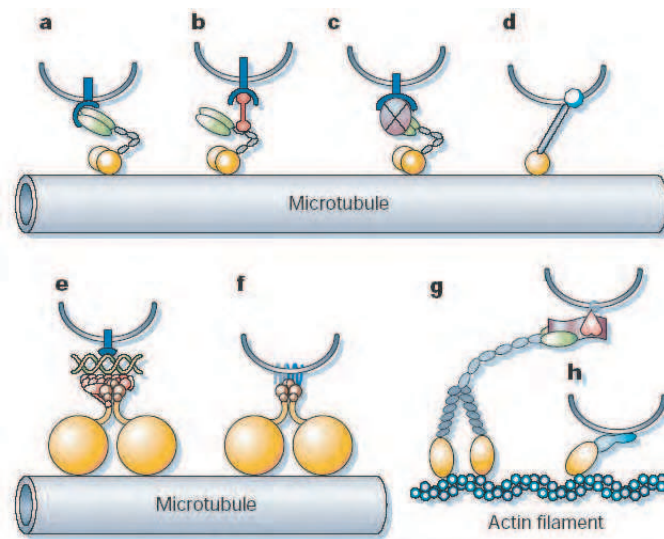


FIG. 1.15 – Les différents types de lien cargo-moteur pour les kinésines (a-d), les dynéines (e-f) et les myosines (g-h). (a) Interaction entre une protéine transmembranaire (bleue) et la chaîne légère de la kinésine (verte) ; (b) entre un récepteur transmembranaire et la chaîne lourde de la kinésine via une protéine (rouge) ; (c) entre un récepteur et la chaîne légère de la kinésine via un complexe protéique (violet) ; (d) entre un phospholipide et un domaine de la kinésine (type Unc104). (e) Interaction entre la dynéine et un récepteur via le complexe dynactine (rouge) et la spectrine (vert) ; (f) lien direct entre la chaîne légère de la dynéine et une protéine transmembranaire : la rhodopsine. (g) Lien entre la queue de la myosine V et la protéine membranaire rab27 (rouge) via la melanophiline (violet) [Wu et al., 2002] ; (h) lien direct entre la myosine et des phospholipides. D’après [Schliwa and Woehlke, 2003].

port mais interviennent aussi dans le tri et la signalisation de ceux-ci. Une partie des mécanismes impliqués vient d’être présentée mais il en existe probablement bien d’autres qu’il reste encore à découvrir. Une des questions cruciales qui se pose maintenant concerne la régulation de ces différents mécanismes de transport, qui est probablement couplée aux mécanismes de coordination des moteurs [Allan and Schroer, 1999]. Il est bien sûr illusoire de vouloir présenter ici, en introduction, l’ensemble des mécanismes de régulation connus actuellement puisqu’il doit en exister autant que de types de protéines impliquées. Je vais donc m’attacher à présenter les principaux mécanismes avec les composants impliqués, car ceux-ci pourraient éventuellement être testés *in vitro* grâce à des systèmes biomimétiques semblables à celui que j’ai développé pendant ma thèse.

A.5 Les mécanismes de régulation du trafic

Pour chaque type d’organite, il existe beaucoup de niveaux de contrôle, à la fois en termes de direction du mouvement et de commutation entre l’état activé et l’état non-activé des nombreuses protéines impliquées. De plus, les organites agissent

quelques fois indépendamment, d'autres fois de façon coordonnée. Enfin, les mécanismes de régulation dépendent fortement de l'état de la cellule dans son cycle cellulaire. On comprend en effet que les informations à échanger entre organites ne seront pas les mêmes si la cellule est en interphase ou en mitose (par exemple [Niclas et al., 1996]). Nous verrons plus loin dans quelle mesure il est possible de valider ces hypothèses par des études *in vitro* du trafic de membrane.

A.5.1 Mécanismes à l'échelle moléculaire

✓ *Phosphorylation des moteurs moléculaires*

La première idée qui vient naturellement lorsque l'on parle d'activer ou désactiver une protéine est le mécanisme de phosphorylation des protéines, qui permet souvent de les faire passer d'un état activé à un état désactivé. Ce mécanisme fait intervenir des kinases et des phosphatases; il a été observé sur différents domaines de la kinésine ([Morfini et al., 2002] par exemple), de la dynéine [Addinall et al., 2001], ou de la myosine [Karcher et al., 2001] *in vivo* et *in vitro* (voir pour revue le tableau 1 dans [Lane and Allan, 1998] pas très récent, et [Schliwa and Woehlke, 2003]). Cependant, la phosphorylation ne peut pas tout expliquer et il n'est pas encore clair dans quelle mesure la liaison avec le cargo est directement affectée.

✓ *Activation de la kinésine par accrochage sur le cargo*

Lorsque la kinésine (au moins la kinésine-1) n'est pas accrochée à un cargo, la queue et la tête sont attachées ensemble et le moteur est bloqué (fig. 1.16) [Hackney et al., 1992, Verhey et al., 1998]. En revanche, quand la kinésine s'accroche à un cargo, un mécanisme encore mal compris provoque le dépliement de la protéine et l'activation de celle-ci. Ce mécanisme est intéressant puisqu'il permet de coupler la régulation du moteur à son accrochage au cargo.

✓ *Couplages entre moteurs*

Nous avons vu au paragraphe A.4.2 que les protéines d'échafaudage qui font le lien entre la kinésine et la membrane avaient aussi des sites d'accrochage pour d'autres moteurs. Il est plus compliqué de comprendre comment ces moteurs coopèrent dans le complexe. Dans le transport RE-Golgi, nous avons vu que des kinésines et de dynéines (attachées à la membrane grâce au complexe dynactine) étaient présentes sur le même cargo et que l'activité des unes ou des autres était contrôlée pour déterminer la direction du mouvement. Il existe pourtant des mécanismes plus complexes de balance des activités des moteurs présents [Rogers et al., 1997, Hollenbeck, 1993, Haimo, 1995] (pour revue [Lane and Allan, 1998]). Il a été montré par exemple *in vitro* que la kinésine avait la capacité d'éclipser le mouvement de la dynéine [Muresan et al., 1996], ce qui peut avoir une importance *in vivo*. De plus, de part sa complexité, la dynactine peut intervenir dans la régulation de la fonction de la dynéine (pour revue [Lane and Allan, 1998]) en jouant sur chacun de ses composants. Enfin, on a établi que le pH cytosolique pouvait avoir une influence sur la régulation de la directionnalité des intermédiaires de transport [Heuser, 1989, Parton et al., 1991].

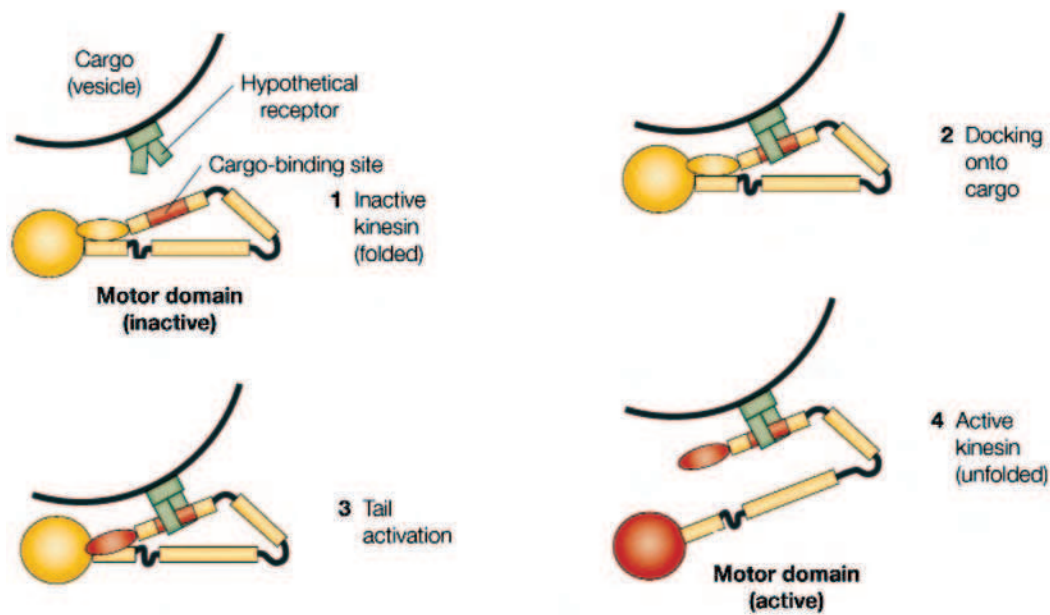


FIG. 1.16 – Modèle d'activation d'un moteur lors de l'accrochage d'un cargo. Etat 1 : Quand le moteur n'est pas attaché à un cargo, le domaine moteur et la queue, suivie du site d'accrochage au cargo (en rouge) sont très proches. Etat 2 : Accrochage du cargo sur le moteur. Etat 3 : Activation de la queue. Etat 4 : Changement de conformation (encore non compris) qui active la kinésine (représentée ici monomérique, mais cela reste vrai pour les kinésines dimérisées). D'après [Woehlke and Schliwa, 2000].

D'autres expériences ont permis de mettre en évidence le mouvement d'intermédiaires sur plusieurs types de filaments (MT et actine) [Brown, 1999]. De plus, il a été montré que la kinésine pouvait interagir directement avec la myosine V [Huang et al., 1999] au niveau de leur queue, mais il reste à déterminer si cette interaction est bien à la base de leur coordination.

✓ Rôle des petites GTPases

Nous avons vu au paragraphe §A.4.1 que des petites GTPases intervenaient au niveau du ciblage des intermédiaires de transport lors du trafic. Nous allons voir maintenant qu'elles jouent aussi un rôle dans le contrôle de ce trafic. Ce qui illustre une fois de plus le lien direct qui existe entre les différents mécanismes de tri, de ciblage, de signalisation et de régulation qui interviennent dans le transport de membrane. Les petites GTPases sont des protéines qui peuvent se trouver dans deux états : un état GTP activé et un état GDP inactivé [Martinez and Goud, 1998]. Elles agissent comme des interrupteurs ou bien des minuteurs de molécules, de façon à réguler leur rôle dans le transport. Des études *in vitro* ont permis de reconstituer le trafic de membrane et ont montré que, dans certains cas, l'action des moteurs était régulée non pas par des kinases ou des phosphatases, mais par des GTPases,

dont l'action avait été modifiée en utilisant des nucléotides GTP non hydrolysables [Fullerton et al., 1998]. Un exemple plus précis de l'action des GTPases est illustré par la protéine Rab6, qui active la Rabkinésine6 [Echard et al., 1998]. Si on imagine que chaque Rab, connue pour intervenir dans la régulation de chaque étape du trafic [Barrett et al., 1999], interagit avec une kinésine particulière, on envisage la façon dont la dynamique des membranes peut être coordonnée [Allan and Schroer, 1999].

✓ *Couplages avec les manteaux*

Le paragraphe §A.4.1 concernait l'existence de différentes protéines de manteau qui sont impliquées dans la déformation de la membrane avant la formation d'intermédiaires de transport vésiculaires. Dans le cas du transport du Golgi vers le RE, il existe deux voies de transport : l'une fait intervenir la protéine de manteau COP-I, l'autre ne dépend pas de COP-I mais de Rab6 [Girod et al., 1999, White et al., 1999]. Sachant que la perte des protéines COP-I à la surface des intermédiaires de transport (par exemple en ajoutant de la BFA [Sciaky et al., 1997]) entraîne une large augmentation du trafic rétrograde Golgi-RE sans changer le transport antérograde, on peut penser que COP-I intervient dans la régulation du trafic et plus particulièrement dans la formation des tubes de membrane (voir pour revue [Lane and Allan, 1998]). Le mécanisme exact de régulation n'est pas connu, mais, au vu de l'exemple de KIF13 qui interagit avec AP-1 (associée à la protéine de manteau clathrine), on peut penser que les moteurs peuvent interagir directement avec les protéines de manteau de façon à coordonner le transport de vésicules. Cette hypothèse de régulation de la formation de tube de membrane par COP-I est un des mécanismes qu'il serait intéressant de tester *in vitro*.

✓ *Autres mécanismes*

Il existe certaines enzymes qui aident à réguler la forme du Golgi et la formation de tubules (stimulation de PLA2 ou inhibition de LPAT) [Drecktrah et al., 2003]. De plus, nous avons vu qu'il existait des protéines qui font un lien direct entre les MTs et la membrane [Klopfenstein et al., 1998], et qui continuent à jouer leur rôle lorsque les moteurs sont inactivés [Burkhardt et al., 1997, Harada et al., 1998]. Ces protéines sont supposées agir comme lien avec des protéines qui font obstacle au mouvement (comme des MAPs et mapmodulines qui contrôlent l'attachement des MAPs aux MTs) [Rickard and Kreis, 1996], elles doivent donc jouer un rôle important dans la régulation du trafic en libérant ou non les voies de transport. En effet, la surexpression de MAPs peut bloquer le trafic de membrane [Bulinski et al., 1997, Ebner et al., 1998].

Enfin, on peut noter l'existence de la régulation de l'activité de la kinésine par la calmoduline qui s'attache près du site d'accrochage des moteurs sur le MT et qui est elle-même activée par la présence de calcium (Ca^{2+}) [Vinogradova et al., 2004].

La liste des mécanismes moléculaires proposés ou démontrés dans ce paragraphe ne reflète probablement qu'une infime partie des différents mécanismes de régulation dont la cellule dispose. Il est possible que certains de ces mécanismes soient couplés avec des mécanismes physiques liés aux propriétés des membranes des différents

organites. C'est ce que nous allons étudier maintenant.

A.5.2 Mécanismes à l'échelle de la membrane

✓ *Gradient de tension entre les compartiments*

Les membranes biologiques ont des compositions très complexes⁷ ; elles contiennent plusieurs sortes de lipides, répartis souvent de façon non homogène (dans des micro-domaines, les "lipid rafts") et non symétrique ainsi qu'une grande quantité de protéines insérées qui, pour la plupart, consomment de l'énergie pour fonctionner et maintenir ainsi la membrane hors-équilibre thermodynamique. De plus, à cause du trafic de membrane, le nombre de lipides présents varie en permanence. Dès lors, la description des membranes biologiques en utilisant des paramètres de physique comme la tension de membrane et la rigidité de courbure définis dans le cas de vésicules géantes unilamellaires (GUVs) purement lipidiques (voir ch.2 §C.3.1) à l'équilibre ne recouvre pas la réalité. Des modèles théoriques plus récents [Manneville et al., 2001, Girard et al., 2004] permettent de décrire de façon plus réaliste les membranes biologiques. Il faut donc garder à l'esprit que la définition de la tension d'une membrane dans une cellule reste un sujet très débattu chez les physiciens.

L'idée qu'un mécanisme physique de la régulation du transport de membrane pouvait exister est issu des expériences de Sciaky et al. [Sciaky et al., 1997] que nous avons déjà mentionnées auparavant. Ils ont montré que, lorsque les cellules vivantes sont traitées avec de la BFA, un large réseau de tubes de membrane se forme à partir du Golgi vers le RE. Le Golgi se redistribue ensuite dans le RE en un temps de l'ordre de 15 à 30 s. L'étude des temps de vie du Golgi après injection de la BFA permet de dire que cette redistribution se fait par un événement discret. Cet événement pourrait par exemple être la fusion d'un tube unique de Golgi avec le RE. La redistribution consisterait alors en un mélange par diffusion des lipides entre les deux organites une fois connectés. L'autre hypothèse possible serait l'absorption unidirectionnelle du Golgi dans le RE (voir les deux schémas fig. 1.17).

Cependant, comme le transport de lipides observé par fluorescence est trop rapide pour être expliqué par de la simple diffusion (et par le transport par des moteurs moléculaires), et que de plus il ne reste aucune trace significative du Golgi à son emplacement après avoir été redistribué, on peut penser que le second mécanisme prédomine. Le transfert de membrane observé a toutes les caractéristiques d'un flux de membrane. Ceci suggère que le flux est induit par une différence de tension entre les compartiments. Le Golgi, compartiment le moins tendu se vide dans le RE, le compartiment le plus tendu. Le gradient de tension permet de générer le mouvement entre les deux compartiments par **effet Marangoni**. Une étude théorique plus récente a permis de modéliser ce transport créé par un gradient de tension entre deux vésicules reliées par un tube de membrane [Davidson et al., 2005].

Des expériences récentes réalisées *in vitro* [Upadhyaya and Sheetz, 2004] ont permis de mesurer la tension des différents compartiments (RE et Golgi) purifiés

⁷Nous reviendrons plus en détail sur la caractérisation des membranes biologiques au ch.2 §C.1.

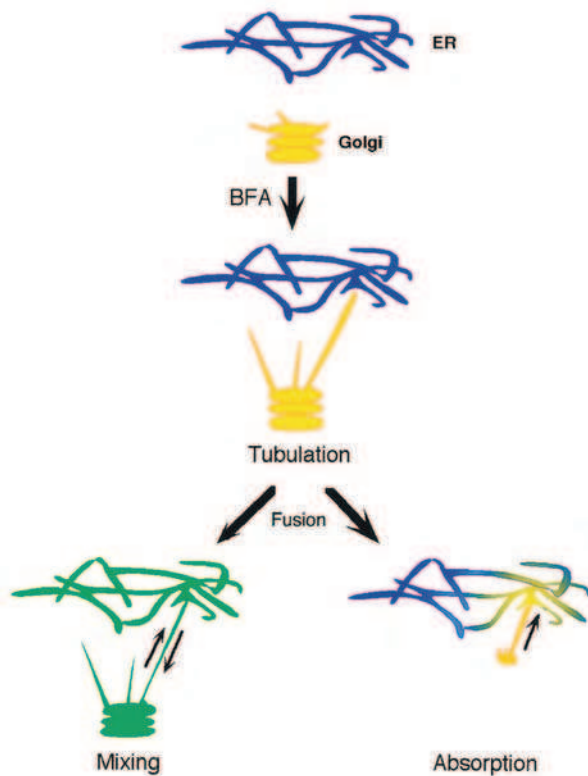


FIG. 1.17 – Les deux mécanismes de redistribution de la membrane du Golgi dans le RE après injection de BFA. A gauche, la redistribution se fait par un mélange de membranes qui s’opère par diffusion le long d’un tube de membrane préformé entre les deux compartiments. A droite, le Golgi est absorbé de façon unidirectionnelle par le RE. Bleu : membrane du RE. Jaune : membrane du Golgi. Vert : mélange de membranes RE-Golgi. .D’après [Sciaky et al., 1997].

et vérifier (*in vitro*) cette hypothèse de différence de tension entre les compartiments. C’est un premier pas dans la validation de ce mécanisme. Cependant, là encore, les interprétations des résultats présentés sont à prendre avec beaucoup de précautions, le pas le plus difficile à franchir étant bien sûr l’assimilation des propriétés mesurées *in vitro* (en l’absence de tout trafic de membrane et de mécanismes de régulation de la tension de membrane, par exemple par l’intermédiaire du complexe acto-myosine) aux propriétés *in vivo*. Une mesure directe de la tension de membrane *in vivo* serait bien sûr la solution idéale mais reste bien difficile à réaliser. La question qui subsiste cependant, en supposant que ce mécanisme soit juste, est comment cette différence de tension est-elle créée au niveau des compartiments? Certaines indications laissent penser que le couplage des organites avec le cortex d’actine par l’intermédiaire de myosines, pourrait avoir un rôle dans le contrôle de la tension de membrane des compartiments [E. Coudrier, Institut Curie, communication personnelle]. Nous avons en effet vu que ce couplage intervient dans la détermination de la forme et l’organisation des organites [Cole and Lippincott-Schwartz, 1995, Rogers and Gelfand, 2000]. Le maintien de la différence de tension entre les organites nécessite de plus une consommation d’ATP. Cependant, le mécanisme de couplage exact reste encore à découvrir.

✓ *Régulation de la formation de tubes de membrane par la tension du compartiment*
 Un deuxième exemple de régulation de la formation de tubes de membrane a été observé *in vivo*, mais sans l’action de drogue [Kleijmeer et al., 2001]. Ces expériences ont été réalisées sur des cellules dendritiques en suivant les récepteurs du CMH de

classe II, présents dans les corps multivésiculaires (sorte d'endosomes tardifs contenant de nombreuses vésicules) (voir §A.2). Lorsque la cellule dendritique est stimulée (par la présence d'un signal chimique), il a été observé que ces corps multivésiculaires formaient des longs tubes de membrane le long de filaments du cytosquelette (fig. 1.18).

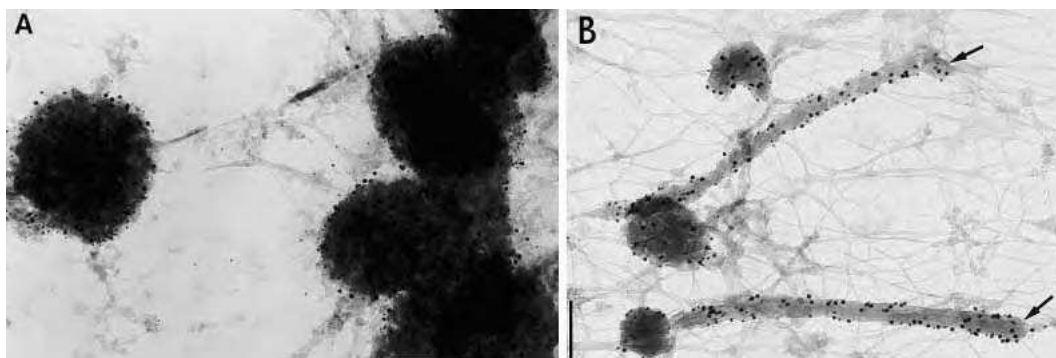


FIG. 1.18 – Forme des corps multivésiculaires (récepteurs de classe 2) avant et après maturation d'une cellule dendritique. Images de microscopie électronique. (A) Témoin : forme des récepteurs avant l'excitation de la cellule. (B) Forme des corps multivésiculaires après 6h de traitement au LPS (lypopolysaccharide) qui sert de signal. On observe la formation de tubes de membrane le long du cytosquelette. Barre= 200 nm. Les petits points noirs correspondent à la position de petites billes d'or fixées aux récepteurs de classe (10 nm de diamètre). D'après [Kleijmeer et al., 2001].

La formation de ces tubes de membrane a été mise en parallèle avec la fusion des petites vésicules présentes à l'intérieur du corps multivésiculaire contenant les récepteurs du CMH de classe II devant être ensuite transportés à la membrane plasmique. Une explication possible serait que les petites vésicules apportent leur surface à la membrane extérieure, alors que le volume de l'ensemble varie peu *a priori*. La tension de membrane des ces lysosomes diminuerait alors rapidement [Solon et al., 2005], facilitant la formation de tubes. Nous reviendrons plus précisément au chapitre 3 sur le lien qui existe entre la tension de membrane et la force nécessaire pour extraire un tube. Cette étude n'a pas montré si des moteurs moléculaires étaient impliqués dans la formation des tubes. En revanche, les auteurs ont montré que ce mécanisme de tubulation vers la membrane plasmique pouvait être un moyen de réguler la présence de certaines protéines au niveau de la surface de la cellule. Il y a donc dans ce cas un couplage entre la régulation physique de la formation de tubes de membrane et l'expression d'une protéine dans un mécanisme immunitaire.

Cette première partie avait pour but de décrire le contexte biologique de l'étude de tubes de membrane. Des tubes ont en effet été observés par différentes techniques (vidéomicroscopie, microscopie électronique, etc.) au niveau de plusieurs compartiments de la cellule (RE, corps multivésiculaires, tubes entre les citernes du Golgi,

etc.) et comme intermédiaires de transport dans le trafic intracellulaire. Les raisons biologiques de l'existence de différentes formes d'intermédiaires de transport restent encore mystérieuses, mais nous avons pu remarquer la grande diversité des mécanismes qui régissent leur formation, leur transport et leur fusion, ainsi que le tri des composants qui s'en suit et leur ciblage, et enfin la régulation de ces différentes étapes de transport. Ces mécanismes dépendent de plus du type de cellules eucaryotes étudiées (animale ou végétale, polarisée ou non), de leur position dans le cycle cellulaire (interphase ou division) et du type de trafic étudié (exocytose ou endocytose, précoce ou tardive). Cette grande complexité, à la fois par le nombre de composants impliqués (qui est, la plupart du temps, loin d'être toujours connu) et par les interactions multiples qui peuvent exister entre eux, rend la vérification des mécanismes postulés extrêmement délicate. Nous allons voir maintenant qu'une bonne façon de compléter les expériences *in vivo* est de reconstituer les mécanismes étudiés *in vitro* de façon à mieux contrôler l'ensemble des composants qui interviennent.

B Reconstitution *in vitro* des tubes de membrane

Les premières expériences *in vitro* ont consisté à reproduire le trafic de membrane avec des compartiments purifiés dans un environnement proche de celui de la cellule, en utilisant des extraits cellulaires (du cytosol de cellules). Nous verrons quels sont les avantages et les inconvénients de ce type d'expériences par rapport à celles où tous les composants utilisés sont purifiés ou artificiels, c'est-à-dire complètement contrôlés.

B.1 en utilisant des extraits de cellule

✓ *Les constituants*

Pour reconstituer *in vitro* les mécanismes du transport intracellulaire le long de MTs, les constituants de base sont :

- des organites purifiés
- des MTs, qui, comme nous l'avons vu au paragraphe A.4.2, sont essentiels puisqu'ils servent de rails au transport. Ces MTs sont stabilisés, c'est-à-dire qu'ils gardent une longueur constante dans le temps.
- des extraits de cellules contenant toutes les protéines nécessaires au transport, y compris les moteurs moléculaires et les protéines nécessaires à leur attachement à la membrane
- de l'ATP.

Plusieurs équipes ont de cette façon reconstitué des réseaux de tubes de membrane le long de MTs avec quelques variations (fig. 1.19). Tout d'abord, Dabora et Sheetz ont utilisé du cytosol et des microsomes bruts de fibroblastes de poussin [Dabora and Sheetz, 1988]. Parallèlement, Vale et Hotani ont utilisé des kinésines de calamars partiellement purifiées dans un tampon qui contenait également des membranes dont la constitution n'était pas déterminée [Vale and Hotani, 1988]. Plus tard, Allan et Vale ont montré que l'utilisation de cytosol d'ovocytes de

Xenopus permettait d'observer la formation de réseaux de tubes de membrane à partir de microsomes d'ovocytes bruts, ou bien de membranes de RE ou Golgi purifiées à partir de foies de rats [Allan and Vale, 1991, Allan and Vale, 1994, Allan, 1995, Niclas et al., 1996, Fullerton et al., 1998].

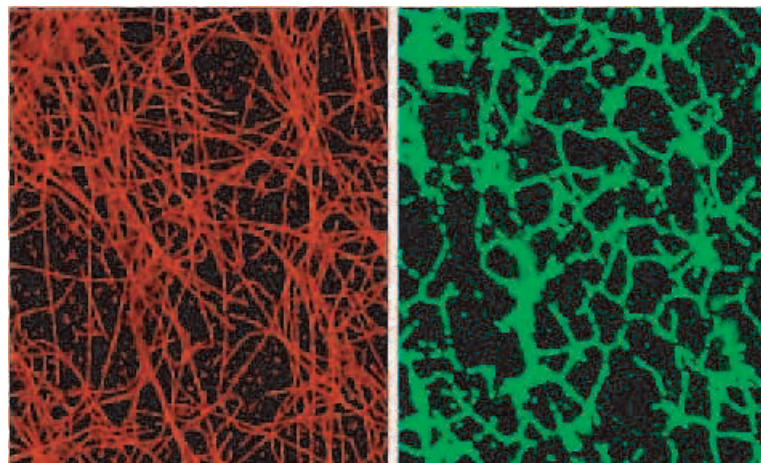


FIG. 1.19 – Réseaux de tubes de RE tirés *in vitro* le long d'un réseau de MTs stabilisés. Les MTs sont à gauche, marqués en rouge et le RE (membrane purifiée à partir de foies de rats) est marqué en vert. Cette photo est à mettre en parallèle avec celle montrant un réseau de RE *in vivo* figure 1.8. Images issues du site internet du groupe de Vicki Allan.

✓ *Avantages de l'utilisation d'extraits cellulaires*

- Le premier avantage vient du fait que l'on peut bloquer une par une les protéines d'intérêt et voir l'influence de chaque protéine sur le réseau de tubes (par exemple la protéine phosphatase 1 [Allan, 1995], ou la kinésine bloquée par un anticorps [Lane and Allan, 1999, Robertson and Allan, 2000]).
- Le deuxième avantage vient du fait que les expériences faites avec des extraits sont plus proches des expériences *in vivo* comparées à celles effectuées dans un simple tampon. Il est ainsi possible de voir l'influence de la position dans le cycle cellulaire de l'extrait utilisé [Allan and Vale, 1991].
- Il est aussi possible d'utiliser les mêmes techniques qu'*in vivo* (immunofluorescence et microscopie électronique) pour déterminer la localisation des protéines d'intérêt [Fullerton et al., 1998, Lane and Allan, 1999].
- Diverses drogues peuvent enfin être utilisées pour déterminer leur influence sur le réseau de tubes de membrane (voir tableau 1.1), ce qui permet de mieux comprendre quels sont les éléments impliqués dans le trafic de membrane.

✓ *Application à l'étude des transports RE-Golgi et Golgi-RE*

Ce genre d'étude a permis de montrer que le mouvement du RE est largement inhibé lorsqu'un extrait de cellules en métaphase est utilisé, ce qui est dû au détachement

B. Reconstitution *in vitro* des tubes de membrane

| Drogue ou réactif | Présence de tubes | Commentaires |
|---|-------------------|---|
| 2 mM ATP AMP-PNP Apyrase | ++ - - | Contrôle Hydrolyse de l'ATP nécessaire Présence d'ATP dans les extraits nécessaires |
| 20 μ M Colchicine 20 μ M Vanadate 100 μ M Vanadate 2 μ M Cytochalasine | - + - ++ | Importance des MTs Inhibition partielle de la kinésine Inhibition totale de la kinésine Pas de rôle du cortex acto-myosine |
| GTP γ S N-Ethhylmaleimide (NEM) EGTA | - - ++ | Motilité régulée par des petites GTPases Nécessité de la fusion de membrane pour avoir des réseaux Pas de rôle du Ca^{2+} dans la motilité |

TAB. 1.1 – Action de différentes drogues ou réactifs sur la formation du réseau de tubes de RE ou de Golgi *in vitro*. Données tirées de [Dabora and Sheetz, 1988, Allan and Vale, 1991]. L'apyrase permet d'enlever l'ATP présent dans les extraits. Sauf dans ce premier encadré qui sert à montrer le rôle d'ATP dans la formation des tubes, il est sous-entendu que 2 mM d'ATP sont ajoutés dans chaque expérience. Le vanadate inhibe les moteurs moléculaires. Cependant, comme la kinésine est peu sensible au vanadate, il faut en ajouter une grande quantité pour bloquer la formation de tube. La cytochalasine permet de dépolymériser en partie le cortex d'actine. Le N-Ethhylmaleimide (NEM) et le GTP γ S sont des inhibiteurs de fusion de membrane, sans eux les réseaux de tubes ne peuvent pas se former. En revanche, le mouvement de petites vésicules reste possible dans le cas du traitement au NEM. La colchicine est une drogue qui détruit les MTs.

des dynéines (et/ou de son complexe associé, la dynactine). Ce détachement coïncide avec l'hyperphosphorylation de la chaîne intermédiaire de la dynéine cytoplasmique [Allan and Vale, 1991, Niclas et al., 1996]. Au contraire, l'utilisation d'extrait de cellules en interphase et d'un inhibiteur des phosphatases permet de stimuler largement le trafic de membranes de RE, sans pour autant affecter le nombre de dynéines accrochées à la membrane [Allan, 1995]. Plus récemment, il a été montré que la direction du mouvement du RE sur les MTs est régulée par les composants présents dans le cytosol des cellules. En effet, le cytosol préparé à partir de cellules de tissu active le mouvement de membranes de RE d'œufs de *Xenopus*, vers l'extrémité "+" des MTs (donc est contrôlé par des kinésines) [Lane and Allan, 1999] alors que le cytosol issu de cellules de jeunes embryons ne l'active pas. La régulation du trafic par les éléments du cytosol dépend donc du type de cellules, comme de l'avancement de leur propre développement.

En ce qui concerne le transport du Golgi vers le RE qui implique des kinésines, des études *in vitro* de transport de membrane ont permis d'isoler des moteurs impliqués dans la formation de tubules en présence de BFA le long de MTs. Ces moteurs doivent

encore être mieux caractérisés, mais ce ne sont pas des kinésines conventionnelles [Robertson and Allan, 2000]. L'utilisation des différents types d'extraits a permis de montrer que la formation de tubules est active avec un extrait de cellules en interphase mais pas avec un extrait de cellules en métaphase, comme ce qui avait été montré dans le cas du RE. Ceci prouve qu'il existe un mécanisme de régulation des kinésines pendant le cycle cellulaire. On peut remarquer ici que les études *in vitro* apportent des réponses complémentaires aux études *in vivo* présentées dans la première partie de ce chapitre, sur les moteurs impliqués dans les trafics RE-Golgi et Golgi-RE.

Il est important de noter enfin qu'il est aussi possible de reconstituer *in vitro* un large réseau de tubes de membrane de RE, même en l'absence de réseau de MT mais en utilisant du cytosol [Dreier and Rapoport, 2000]. Même si les protéines impliquées dans la formation d'un tel réseau interconnecté n'ont pas été isolées, il est possible d'en déduire que le cytosol possède tous les composants nécessaires à la modification et la régulation des réactions de fusion de membranes pour former des tubes à partir de vésicules.

✓ *Mise en évidence d'un domaine globulaire au niveau du bout du tube*

Allan et Vale ont étudié la formation de réseaux de tubes de membrane de Golgi et de RE *in vitro* [Allan and Vale, 1994](fig. 1.20 (A)). Ils ont mis en évidence la présence d'un domaine globulaire au bout des tubes en train d'être tirés. Ces domaines sont plus gros dans le cas du Golgi et probablement enrichis en moteurs moléculaires étant donné leur interaction avec les MTs (fig. 1.20, (B-a)). Une étude en immunofluorescence a permis de montrer qu'ils contiennent de l'albumine et des produits de sécrétion (particulièrement dans le cas des tubes de Golgi, d'où la taille des domaines). La localisation des moteurs n'a pourtant pas pu être menée à terme, peut-être à cause de la trop faible sensibilité des études par immunofluorescence ou bien parce que le nombre de moteurs nécessaires pour tirer le tube n'est pas suffisamment important. Nous verrons par la suite (au chapitre 5), que les expériences que nous avons réalisées sont en mesure de contourner ce genre de problème, de façon à mettre en évidence de façon quantitative la position des moteurs nécessaires qui tirent un tube.

✓ *Inconvénients de l'utilisation d'extraits cellulaires*

On peut finalement reprendre les arguments utilisés sur le problème du nombre inconnu de constituants impliqués dans la formation des tubes *in vivo*. En effet, les extraits contiennent énormément de protéines qui interviennent ou non, mais il est impossible de comprendre quels sont les constituants minimaux nécessaires pour former un tube. On a même vu dans certains cas que des tubes pouvaient être obtenus sans MT. La meilleure façon de déterminer les constituants minimums est donc d'utiliser des éléments complètement purifiés ou artificiels et contrôlés. Il n'y aura alors plus de doute sur les constituants indispensables à la formation et à l'élongation des tubes.

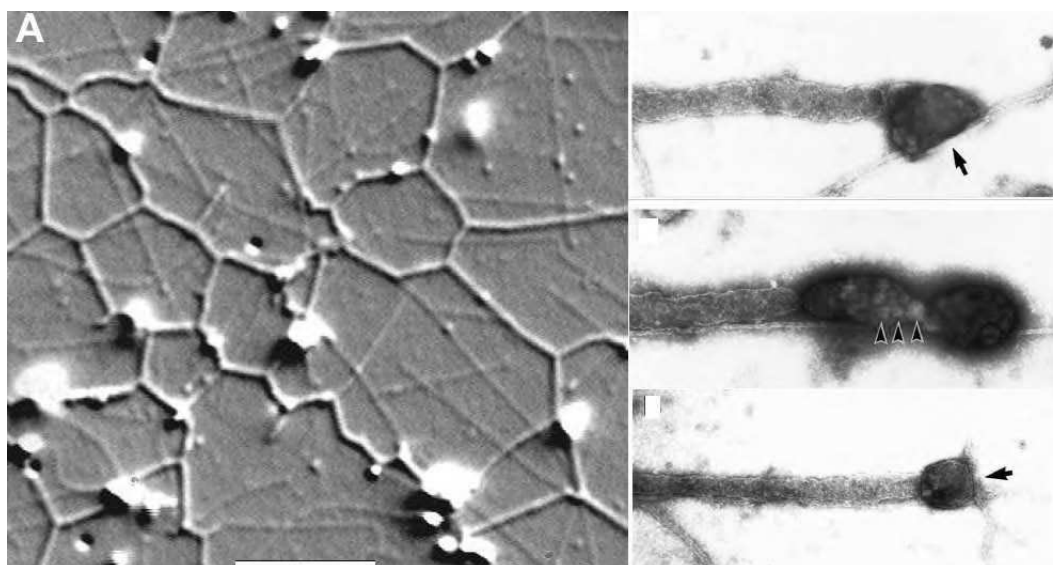


FIG. 1.20 – (A) Réseaux de tubes de Golgi tirés *in vitro* le long d'un réseau de MTs stabilisés (membrane purifiée à partir de foies de rats) observés en DIC. Des images similaires ont été obtenues dans le cas de réseaux de RE. Barre=5 μm . (B-a,b,c) Trois images en microscopie électronique du domaine globulaire situé à l'extrémité de tubes de Golgi. On remarque la forte interaction avec le MT dans le cas de (a). La plupart du temps, les tubes sont alignés avec les MTs. Leur diamètre peut être évalué à une centaine de nm. Barre=200 nm. D'après [Allan and Vale, 1994].

B.2 en utilisant uniquement les composants nécessaires

Faisant suite aux expériences *in vitro*, on peut supposer que les constituants absolument nécessaires seraient un réservoir de membrane, des MTs, des moteurs moléculaires et de l'ATP. Les premières expériences réalisées dans ce sens ont été réalisées par A. Roux et al. dans les groupes de Patricia Bassereau et Bruno Goud [Roux et al., 2002]. Pour pouvoir contrôler tous les constituants présents, les membranes purifiées ont été remplacées par des vésicules géantes unilamellaires (GUVs). Ce sont des bicouches lipidiques dont la composition est connue et contrôlée. De même, les extraits ont été remplacés par un tampon contenant uniquement des kinésines purifiées et de l'ATP. Dans ces premières expériences, les kinésines utilisées (possédant une biotine à l'extrémité opposée aux sites d'accrochage sur le MT) étaient accrochées à la membrane qui contenait aussi des lipides biotinylés grâce à des petites billes de latex couvertes de streptavidines (diamètre d'environ 100 nm) (fig. 1.21(A)).

Les expériences de contrôle qui consistaient à enlever un seul des composants minimaux, soit :

- les vésicules
- les MTs
- les kinésines, moteurs moléculaires effectuant le transport

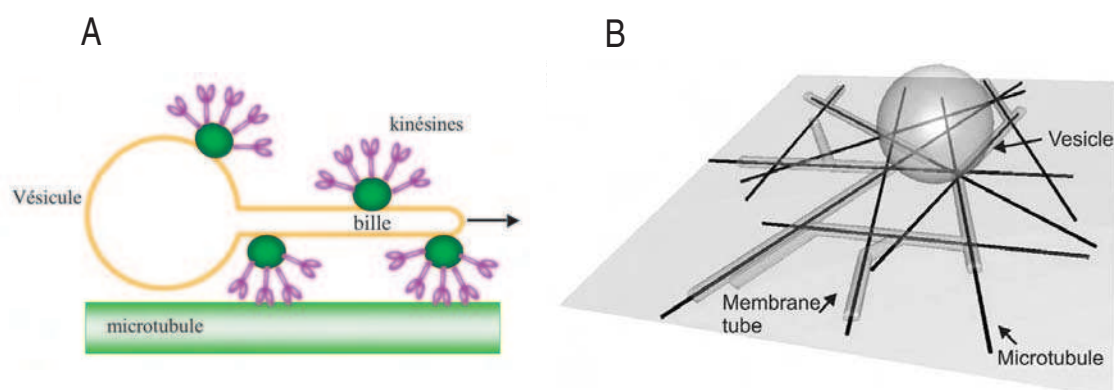


FIG. 1.21 – Schéma de la formation de réseaux de tubes de membrane. (A) Représentation schématique d'un tube de membrane tiré à partir d'une vésicule géante unilamellaire par des petites billes recouvertes de kinésines, le long d'un MT en présence d'ATP. D'après [Roux et al., 2002]. (B) Formation d'un réseau de tubes de membrane à partir d'une vésicule, le long d'un réseau de MTs. D'après [Koster et al., 2003].

– l'ATP, carburant pour les kinésines ont été réalisées et aucun tube n'a en effet pu être observé. Ceci prouve que ce système constitue bien un **système minimal, mimant le trafic intracellulaire**. On peut remarquer de plus que des tubes de membranes golgiennes biotinylées ont aussi pu être tirés dans des conditions similaires [Roux et al., 2002], en l'absence d'extraits cellulaires.

Ces expériences ont permis de montrer que la seule action des moteurs moléculaires était suffisante pour déformer la membrane jusqu'à former un tube (fig. 1.22(a)). Ainsi, l'ensemble des composants impliqués dans la déformation des membranes au moment du "budding" (les protéines de manteau, les phosphoinositides, non présents dans les vésicules) ne sont *a priori* pas nécessaires. Cela ne signifie bien sûr pas que ces composants ne jouent pas un rôle *in vivo*, mais plutôt qu'ils interviennent à des étapes différentes du trafic, comme par exemple dans le recrutement des moteurs et du cargo à la surface de la membrane, dans le tri des molécules ou encore dans la régulation de ces mécanismes. On comprend ici tout l'intérêt qui suscite l'approche *in vitro* de la description du trafic de membrane puisqu'il serait, en théorie, possible de tester au cas par cas chacun des mécanismes présumés (ou moins dans les cas faisant intervenir un petit nombre de composants), dans la mesure où il est possible de purifier et d'incorporer les protéines impliquées.

Parallèlement aux expériences réalisées à l'Institut Curie, le groupe de Marileen Dogterom (AMOLF, Amsterdam) a aussi eu l'idée de reproduire *in vitro*, avec un système équivalent, les étapes principales de la formation d'intermédiaire de transport. Ils ont réussi à tirer des tubes de membrane à partir de vésicules géantes, mais cette fois, sans utiliser de petites billes de latex pour attacher les moteurs aux lipides de la membrane [Koster et al., 2003]. Ils ont ainsi montré que les moteurs,

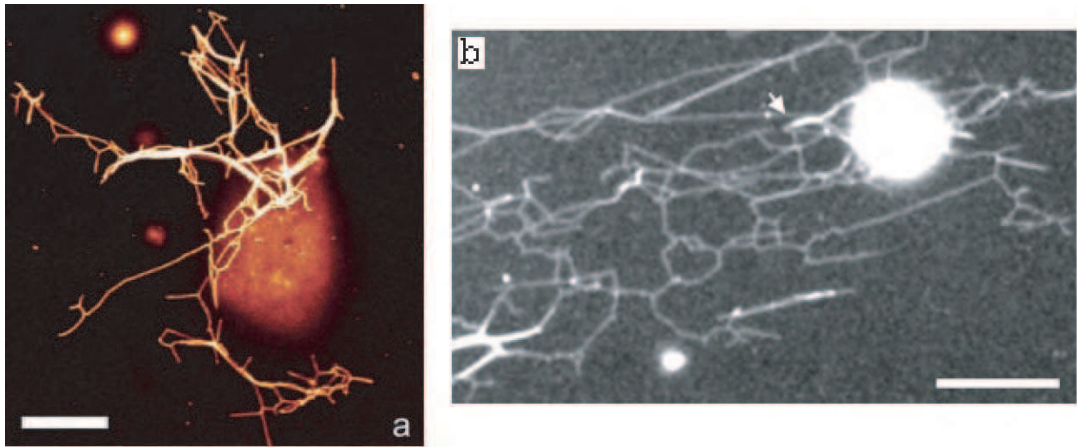


FIG. 1.22 – Réseaux de tubes de membrane. (a) Image d'un réseau de tubes de membrane (marquée en fluorescence) obtenue en fixant les moteurs sur des billes de latex. Projection de différents coupes effectuées en microscopie confocale. Barre= $5 \mu\text{m}$. D'après [Roux et al., 2005b]. (b) Image obtenue en vidéomicroscopie d'un réseau de tubes de membrane tiré à partir d'une vésicule fluorescente par des kinésines fixées directement à la membrane. Barre= $10 \mu\text{m}$. D'après [Koster et al., 2003].

en s'attachant directement à la membrane au niveau moléculaire, pouvaient la déformer sur des échelles de l'ordre du micron (fig. 1.22(b)). Les différences entre ces deux types d'expérience seront discutées au chapitre 5, dans le cadre d'une description complète de la formation des tubes.

Dans les deux cas, il a été possible de faire des mesures cinétiques pour caractériser la dynamique de croissance des tubes, et de varier qualitativement les paramètres importants pour la formation de ces tubes :

1. la rigidité de courbure de la membrane (en changeant sa composition lipidique)
2. la tension de membrane
3. la quantité de kinésines attachées à la membrane.

Cependant, comme ces différents paramètres n'étaient pas contrôlés précisément, aucune conclusion ne pouvait être tirée. La première partie de ma thèse a donc consisté à mettre au point un protocole qui permet de mesurer ou de contrôler l'ensemble des paramètres qui caractérisent le système. Il a ensuite été possible de décrire complètement la physique de formation et de croissance des tubes de membrane à la fois théoriquement et expérimentalement de façon cohérente, en faisant varier de façon indépendante toutes les paramètres importants.

Résumé

Pour résumer ce qui a été dit dans ce chapitre, j'ai cherché à montrer la complexité du trafic intracellulaire, ainsi que les outils qui sont actuellement à notre

disposition pour étudier ce trafic. Dans une approche "biologique", la première étape de compréhension du trafic consiste à déterminer quelles sont les protéines ou composants impliqués dans un phénomène observé, par exemple la déformation de la membrane. Il faut ensuite pouvoir les suivre *in vivo* avec une sensibilité et des résolutions spatiale et temporelle suffisantes. Les observations nécessitent souvent des modifications de la cellule qui peuvent elle-mêmes influencer le mécanisme étudié. Les interactions entre les différents composants et entre ceux-ci et les membranes sont multiples, et tous les composants impliqués ne sont probablement pas identifiés. Les mécanismes qui régissent l'ensemble du trafic moléculaire sont donc loin d'être éclaircis.

L'intérêt des expériences *in vitro* suggérées par un problème biologique précis, présenté dans la deuxième partie, est de pouvoir tester directement les mécanismes proposés. Dans le cas de la formation des intermédiaires de transport intervenant dans le trafic de membranes entre les différents compartiments de la cellule, nous allons voir au cours de cette thèse quelles réponses peuvent apporter les expériences réalisées *in vitro* sur un système minimal mimant la formation de ces intermédiaires de transport. Je me suis particulièrement focalisée sur le rôle des moteurs et des paramètres physiques qui décrivent la membrane. Le système, bien que simplifié, permettra d'apporter une nouvelle approche du trafic, en proposant des mécanismes physiques qui sont souvent masqués par des mécanismes moléculaires.

Chapitre 2

Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

Le but de ce chapitre est de décrire les différents constituants du système minimal mimant la formation de tubes mis au point auparavant par A. Roux ou G. Koster et que j'ai également développé dans ma thèse : les microtubules (MTs), les kinésines et les vésicules géantes unilamellaires qui modélisent les membranes des organites. Dans cette partie, je m'attacherai surtout à décrire les principales propriétés biochimiques et physiques des moteurs et des membranes qui interviennent dans la dynamique d'extraction et de croissance des nanotubes de membrane.

A Les microtubules, rails du trafic intracellulaire

Avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, les microtubules forment la troisième classe principale de filaments du cytosquelette. Ces réseaux complexes permettent l'organisation interne dans l'espace des cellules eucaryotes.

A.1 Structure d'un microtubule

Les MTs sont formés par auto-assemblage d'une molécule dimérique : la tubuline. Cette molécule a une taille de 8 nm et est constituée de deux sous-unités α et β . Les dimères s'alignent selon des protofilaments linéaires en alternance autour d'un noyau central qui apparaît vide sur les images de microscopie électronique, formant ainsi une structure tubulaire creuse (fig. 2.1 (A-B)). Un MT est alors composé de 13 protofilaments généralement, sauf cas particulier [Eichenlaub-Ritter and Tucker, 1984], ce qui lui confère une grande stabilité thermique. Les protofilaments sont assemblés en parallèle¹, avec la même polarité, pour former un cylindre de 25 nm de diamètre (fig. 2.1 (C-E)) [Amos and Baker, 1979].

¹les MTs contenant un autre nombre que 13 protofilaments ne sont pas droits mais hélicoïdaux [Chretien and Wade, 1991]

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

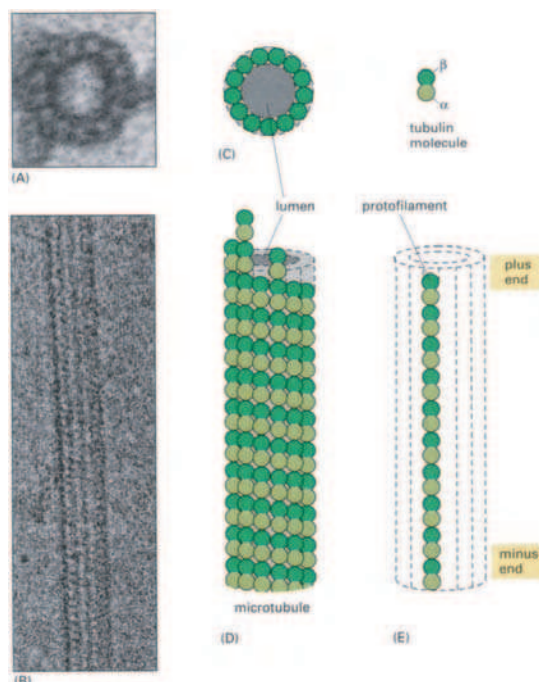


FIG. 2.1 – Structure d’un microtubule, d’après [Alberts et al., 2002] (A) Micrographie électronique d’un MT observé en coupe transversale montrant son anneau de 13 sous-unités distinctes, chacune correspondant à une molécule de tubuline différente (α ou β) (Images : Richard Link). (B) Micrographie électronique à congélation d’un MT assemblé *in vitro* (Richard Wade). (C-D) Représentations schématiques d’un MT montrant la façon dont les molécules de tubuline sont associées pour former la paroi cylindrique (d’après les dessins fournis par Joe Howard). Notons qu’un MT peut aussi être vu comme un assemblage de trois hélices de monomères imbriquées ([Howard, 2001], p 126). (E) Schéma d’un protofilament dont est composé un MT, lui-même composé de dimères de tubuline.

Le MT a donc une structure polaire résultant de l’asymétrie structurale qui induit une différence de réactivité entre ses deux extrémités ; il est possible de distinguer l’extrémité *moins* (à croissance lente) de l’extrémité *plus* (à croissance rapide) [Alberts et al., 1995]. Cette structure hautement dynamique du MT nécessite un apport d’énergie permanent qui résulte de l’hydrolyse du GTP (Guanosine Triphosphate) fixé par les sous-unités sous leur forme active ; c’est un processus dissipatif [Tabony and Job, 1990, Mitchison, 1993]. En effet la phase de croissance (polymérisation) d’un MT se fait par addition de dimères de tubuline portant du GTP aux extrémités de celui-ci. Comme le GTP est presque immédiatement hydrolysé, le MT est essentiellement constitué de tubuline-GDP qui a tendance à déstabiliser sa forme linéaire. Les phases de croissance sont donc suivies de phases de catastrophe (ou dépolymérisation) très rapides où la tubuline-GDP est éjectée. Cette alternance de phases de polymérisation et dépolymérisation constitue une ”instabilité dynamique” ; elle a été observée à la fois *in vitro* [Mitchison and Kirschner, 1984], et *in*

A. Les microtubules, rails du trafic intracellulaire

in vivo [Sammak and Borisy, 1988] (fig.2.2).

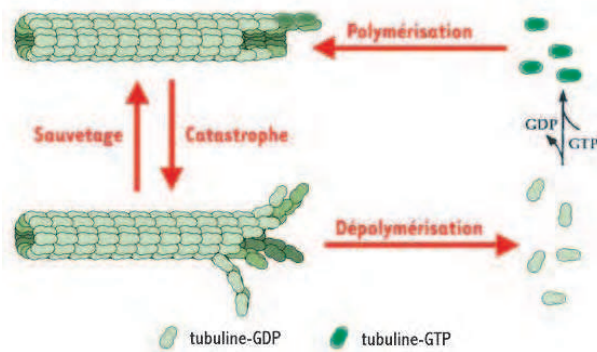


FIG. 2.2 – Instabilité dynamique d'un microtubule. La tubuline-GTP est incorporée aux extrémités d'un MT lors de la phase de polymérisation. Le GTP est hydrolysé et la phase de polymérisation est suivie par une phase de dépolymérisation très rapide où la tubuline-GDP est éjectée. Cette dernière est ensuite régénérée en tubuline-GTP (adaptée de [Desai and Mitchison, 1997] et du site internet www.erudit.org).

Il est possible de bloquer la dynamique de croissance et décroissance des MTs en utilisant une drogue, le taxol, très utilisée comme médicament anti-cancéreux. Le taxol est une molécule qui se lie étroitement aux MTs et les stabilise en bloquant leur dépolymérisation. Nous l'avons utilisée lors de la formation de MTs stabilisés *in vitro* (voir le ch4. §A); la drogue est ajoutée quand le microtubule a atteint sa longueur d'équilibre (voir fig. 2.3).

La conséquence principale pour les MTs de cette structure composée de protofilaments alignés est leur grande **rigidité**. Le paramètre le plus adapté pour décrire cette propriété physique importante est la longueur de persistance qui mesure la longueur typique sur laquelle la courbure due aux fluctuations thermiques devient appréciable et plus exactement, la distance au-delà de laquelle l'ordre orientationnel le long du MT est perdu. La longueur de persistance d'un MT est de l'ordre du mm [Venier et al., 1994, Mickey and Howard, 1995], beaucoup plus grande que celle de l'actine ($15 \mu\text{m}$ [Yanagida et al., 1984]) ou de l'ADN (50 nm [Hagerman, 1988]). Sachant que la longueur des MTs est de l'ordre de la taille d'une cellule (soit environ quelques microns) puisqu'ils sont généralement nucléés au niveau du centrosome près du noyau (position de leurs extrémités (-)) et s'étendent jusqu'à la membrane plasmique (positions de leurs extrémités (+)), les MTs ont une taille bien plus petite que leur longueur de persistance. En l'absence de force appliquée, ils ne sont donc pas courbés à l'échelle de la cellule mais la polymérisation peut créer des forces capables de les courber. Les MTs forment un réseau très organisé, ce que l'on peut observer dans la figure 2.4(a) du paragraphe suivant.

A.2 Fonctions dans la cellule

Les MTs ont un rôle essentiel dans la cellule, puisqu'ils interviennent dans son organisation interne et plus particulièrement dans le positionnement de ses organites [Cole and Lippincott-Schwartz, 1995], dans sa forme

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

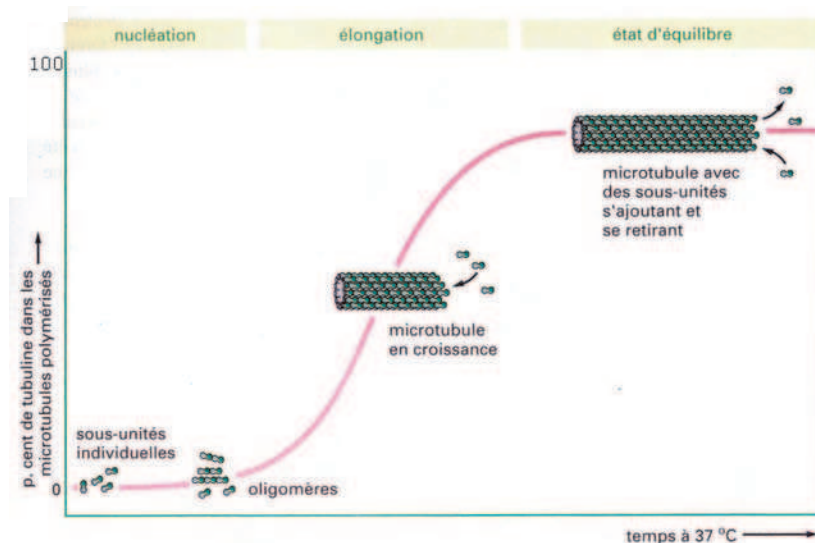


FIG. 2.3 – Un mélange de tubuline, de tampon et de GTP est chauffé à 37°C au temps zéro. La quantité de microtubules polymérisés, mesurée par diffraction de la lumière, suit une courbe sigmoïdale. Pendant la phase de latence, des molécules de tubuline individuelle s’associent pour former des agrégats métastables, dont certains poursuivent leur croissance et forment des microtubules. La phase de latence reflète la barrière cinétique de ce processus de nucléation. Pendant la phase d’élongation rapide, des sous-unités s’ajoutent aux extrémités libres des MTs existants. Pendant la phase en plateau, la polymérisation et la dépolymérisation sont en équilibre. Pour simplifier, on ne représente les sous-unités s’ajoutant et se retirant au MT qu’à une seule extrémité (d’après [Alberts et al., 1995]).

[Kirschner and Mitchison, 1986], ainsi que dans certaines de ses fonctions. Ils composent notamment le fuseau mitotique [Inoue, 1981] et permettent de séparer les chromosomes des deux cellules filles pendant la mitose [Salmon et al., 1984]. Plus récemment, il a été montré que la dynamique de croissance/décroissance des MTs peut générer des forces dans la cellule (voir par exemple [Grill et al., 2003] et la revue [Dogterom et al., 2005]), ce qui permet de mieux comprendre leur rôle dans la mitose par exemple. Ils servent aussi de rails pour le transport des cargos entre les différents organelles ; le déplacement des cargos est alors assuré par les moteurs moléculaires associés aux MTs qui peuvent se déplacer dans une direction ou l’autre suivant le type de moteur. Il existe deux classes de moteurs : les dynéines, qui se déplacent majoritairement vers l’extrémité *moins* (de la périphérie de la cellule vers le noyau), et les kinésines qui se déplacent majoritairement vers l’extrémité *plus* (du noyau vers la périphérie) (fig.2.4).

Mallik et Gross [Mallik and Gross, 2004] proposent une étude comparative de ces deux classes de moteurs (kinésines et dynéines) et des myosines (moteurs moléculaires associés aux filaments d’actine) : les auteurs concluent que les kinésines sont

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

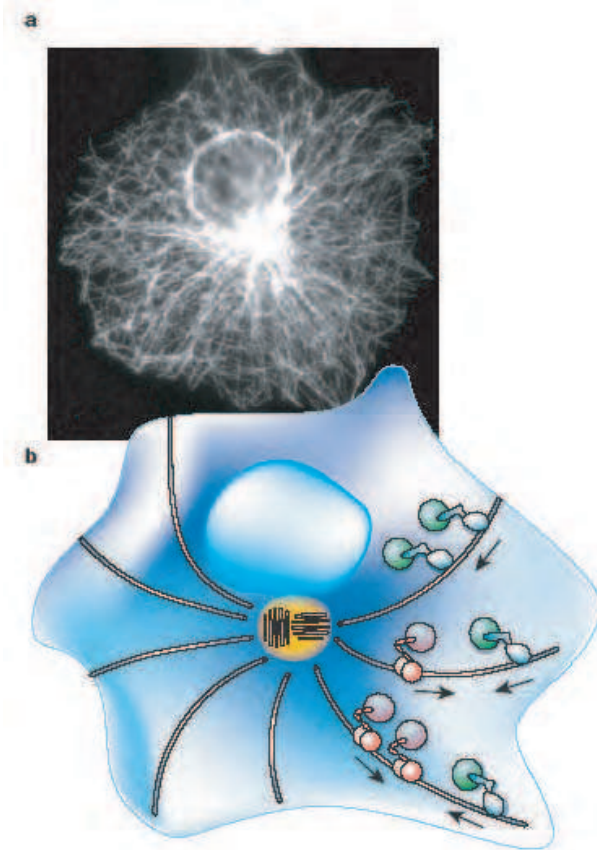


FIG. 2.4 – Distribution des MTs dans la cellule. (a) Cellule en interphase fixée avec un anticorps anti-tubuline fluorescent. Les microtubules apparaissent fluorescents et s'étendent du centrosome (près du noyau) vers la périphérie de la cellule. (b) Diagramme représentant une cellule. Le centrosome est en jaune; les cargos allant du centre vers la périphérie sont en rose et les cargos allant de la périphérie vers le centre (transport rétrograde) en vert, d'après [Howard and Hyman, 2003].

des transporteurs robustes et efficaces², ce qui laisse peu de place à la régulation de leur fonction. En revanche, comme les dynéines sont des moteurs moins robustes et moins efficaces (car très complexes), elles nécessitent un plus grand nombre de protéines associées et ne peuvent fonctionner qu'en grande quantité, ce qui permet un plus grand contrôle de leurs fonctions. Il est donc possible que la cellule contrôle le trafic en ajustant précisément la contribution relative des dynéines par rapport aux autres moteurs.

B Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

B.1 Structure, fonction et propriétés physiques

La super-famille des kinésines, dont les principaux membres sont présentés dans [Hirokawa, 1998], se compose de nombreuses sous-familles récemment répertoriées avec une nouvelle nomenclature [Lawrence et al., 2004]. En effet, l'étude systématique du génome des différents organismes entraîne souvent la mise en évidence de nouvelles sortes de kinésines; différents noms sont apparus pour décrire les mêmes moteurs d'où l'idée de faire une nouvelle classification, unique et reconnue

²car un moteur unique peut transporter un cargo sur une longue distance

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

par tous, pour limiter les confusions. Comme les autres moteurs moléculaires, la kinésine est une protéine qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour générer des mouvements et des forces.

B.1.1 Fonctions dans la cellule

Les kinésines sont impliquées entre autres dans le transport de membranes, la mitose et la méiose, le transport de l'ARN et des protéines, la genèse de cils et de flagelles [Gibbons, 1981], la transduction du signal, ainsi que dans la dynamique de polymérisation des MTs [Goldstein and Philp, 1999]. Plus généralement, les kinésines sont impliquées dans beaucoup de processus de génération de forces et de mouvements. Il existe par exemple 6 kinésines distinctes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 16 chez les nématodes *C. Elegans* et 40 chez l'homme [Alberts et al., 2002]. La caractérisation fonctionnelle des différents moteurs moléculaires pourrait aider à répondre aux questions de ciblage et de régulation : comment un moteur trouve-t-il son cargo ? Qu'est-ce qui le dirige vers la bonne cible ? Comment son activité est-elle régulée durant le processus ? [Schliwa and Woehlke, 2003].

Nous nous bornerons dans ce manuscrit à l'étude des kinésines conventionnelles (nommée kinésine-1 dans la nouvelle nomenclature), car elles sont impliquées dans le trafic intracellulaire d'intermédiaires de transport le long des MTs ; ce sont donc celles que nous avons utilisées pour mimer un tel transport. Elles ont aussi d'autres fonctions dans la cellule, moins directement liées à notre sujet : les kinésines-1 sont par exemple impliquées dans le transport d'organites (mitochondries, reticulum endoplasmique) et participent à l'organisation de l'appareil de Golgi (voir la revue [Lane and Allan, 1998]). La kinésine-1 joue aussi un rôle dans le transport de cargos protéiques non membranaires (la vimentine par exemple), et dans la régulation locale de l'assemblage des filaments intermédiaires [Prahlad et al., 1998].

B.1.2 Structure de la kinésine

La kinésine-1 est le premier moteur moléculaire cytosolique associé aux MTs à avoir été découvert [Vale et al., 1985a, Brady, 1985, Scholey et al., 1985]. Elle est capable de se lier aux MTs et, en présence d'ATP, d'exercer une force nécessaire pour déplacer des particules le long de microtubules vers leur extrémité plus [Vale et al., 1985b]. La kinésine-1, dont la structure est représentée en figure 2.5, est constituée d'un tétramère de deux chaînes lourdes (environ 120 kDa) et deux chaînes légères (environ 64 kDa).

Chaque chaîne lourde contient :

- un domaine moteur de 10 nm de diamètre environ, qui s'attache au microtubule et contient le site de fixation de l'ATP [Scholey et al., 1989],
- un cou,
- une longue chaîne qui donne une double hélice coiled-coil lors de la dimérisation des chaînes lourdes,

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

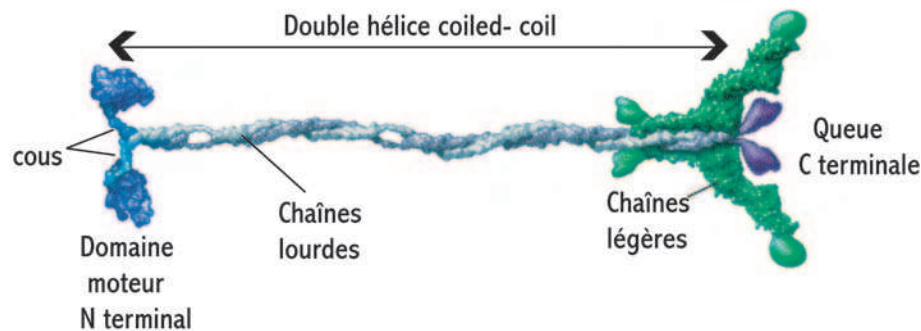


FIG. 2.5 – Structure de la kinésine-1. Les deux chaînes lourdes sont représentées en bleu : d'un côté se trouve le domaine moteur N terminal, et de l'autre, la queue C terminale qui peut s'attacher de façon spécifique aux différents cargos. Les deux côtés sont reliés par une double hélice "coiled coil". Les chaînes légères sont représentées en vert, elles permettent aussi de s'accrocher aux cargos. Figure issue de [Vale, 2003]

– une queue.

Les chaînes légères sont situées au niveau de la queue [Yang et al., 1989]. La longueur totale de la kinésine-1 est d'environ 80 nm. Lorsque le moteur n'est pas activé, la queue et la tête sont attachées ensemble et le moteur est bloqué [Hackney et al., 1992, Verhey et al., 1998]. Cette activation du moteur avait déjà été mentionnée au chapitre 1 à propos des mécanismes de régulation du trafic intracellulaire.

Des études récentes ont montré que les cargos pouvaient se fixer de façon spécifique au niveau de la queue de la kinésine ou bien au niveau des chaînes légères (mais une kinésine peut fixer plusieurs cargos et un cargo peut être transporté par différentes kinésines [Schliwa and Woehlke, 2003, Wozniak et al., 2004]). Les deux types d'interaction (avec la queue ou les chaînes légères) sont différents mais peuvent probablement coopérer lors de **l'activation du moteur quand un cargo s'accroche** [Coy et al., 1999a, Seiler et al., 2000] (fig.1.16 du ch.1). Cette coopérativité entre les sites d'accrochage du cargo sur un même moteur peut jouer un rôle dans la régulation de sa fonction mais le mécanisme exact reste à élucider. De plus, le problème de régulation du trafic des cargos fait probablement intervenir plusieurs types de moteurs associés au même cargo (kinésines se déplaçant vers des extrémités opposées, dynéines, comme dans [Ligon et al., 2004, Sakamoto et al., 2005] ou myosines [Huang et al., 1999]) dont la coopérativité reste à explorer [Vale, 2003].

Le domaine moteur de la kinésine est la seule partie qui est conservée entre les différentes sous-familles. Il s'appelle "moteur" car c'est à son niveau qu'à lieu le changement de conformation qui entraîne le mouvement de toute la protéine après l'hydrolyse d'une molécule d'ATP [Howard, 1997, Schief and Howard, 2001]. Ce changement de conformation est amplifié (de l'angstrom au nanomètre) grâce à la partie qui lie le cou au domaine moteur (le "neck linkers", enchaînement de 13 acides aminés, voir fig. 2.5) qui sert de levier. Il a été montré que ce

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

lien ainsi que la région du cou jouent un rôle important dans la motilité, la directionnalité [Rice et al., 1999, Endow and Higuchi, 2000], la processivité de la kinésine-1 [Romberg et al., 1998, Sablin, 2000, Thorn et al., 2000] et plus précisément dans la coopérativité entre les deux têtes [Vale and Milligan, 2000, Sablin and Fletterick, 2004]. Le paragraphe suivant va définir plus précisément ces propriétés physiques.

B.1.3 Propriétés physiques

La kinésine-1 :

- avance le long d'**un seul protofilament** [Ray et al., 1993, Hoenger et al., 2000] vers son **extrémité (+)** [Hirokawa, 1998]. C'est une kinésine où les domaines moteurs sont N terminaux. Les kinésines dont le domaine moteur est C-terminal avancent vers l'extrémité (-) du MT. L'unidirectionnalité du mouvement pourrait être expliquée par l'existence d'une tension interne entre les deux têtes du moteur lorsqu'elles sont simultanément attachées sur le MT. D'abord proposée par Hancock et Howard [Hancock and Howard, 1999], cette hypothèse est confortée par les expériences de [Rosenfeld et al., 2003] et du groupe d'Ishiwata [Uemura et al., 2002, S.Uemura and Ishiwata, 2003] qui ont montré qu'une force appliquée dans la direction du mouvement permet de réguler la fixation de l'ADP sur la kinésine³, ainsi que par le modèle théorique de Derényi et al [Derényi and Vicsek, 1996]. On a aussi compris grâce à des études en microscopie électronique que le MT peut jouer un rôle actif dans le mouvement et/ou la directionnalité de la kinésine-1 [Hoenger and Milligan, 1997, Krebs et al., 2004].

- fait des **pas de 8 nm**, taille d'un dimère de tubuline (mesures par pinces optiques [Svoboda et al., 1993, Hua et al., 1997, Kojima et al., 1997]). La taille du pas ne dépend pas de la force appliquée [Nishiyama et al., 2002].

- hydrolyse **une molécule d'ATP** par pas. Ce résultat a été obtenu par des mesures d'activité ATP-asiq combinées à des mesures de cinétiques avec des "bead assays" (voir §B.2.1 suivant) en condition de molécule unique [Coy et al., 1999b] à 1 mM d'ATP. L'énergie chimique obtenue par hydrolyse de l'ATP (environ 20-25 $K_B T$ dans la cellule) est convertie en énergie mécanique grâce à une série de changements de conformation de la protéine liés à l'attachement et au détachement des nucléotides [Cross et al., 2000, Schief and Howard, 2001]. Elle sert à franchir la barrière de potentiel qui existe entre les différentes conformations [Schnitzer et al., 2000]. Cette barrière est de l'ordre de 5 $K_B T$ à force nulle et augmente lorsqu'une force croissante est appliquée dans le sens inverse du mouvement (rétrograde). Le cycle ATP-asiq est détaillé dans [Howard, 2001] p.241, par exemple, et est représenté

³Le mécanisme postulé est le suivant : la tête avant aide la tête arrière à se détacher en tirant dessus et donc en l'empêchant de relarguer son ADP, ce qui déstabilise sa liaison avec le MT. La tête arrière quant à elle tire sur la tête avant et l'empêche de fixer une molécule d'ATP [Asbury, 2005]. Voir le détail du pas figure 2.6.

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

fig. 2.6.

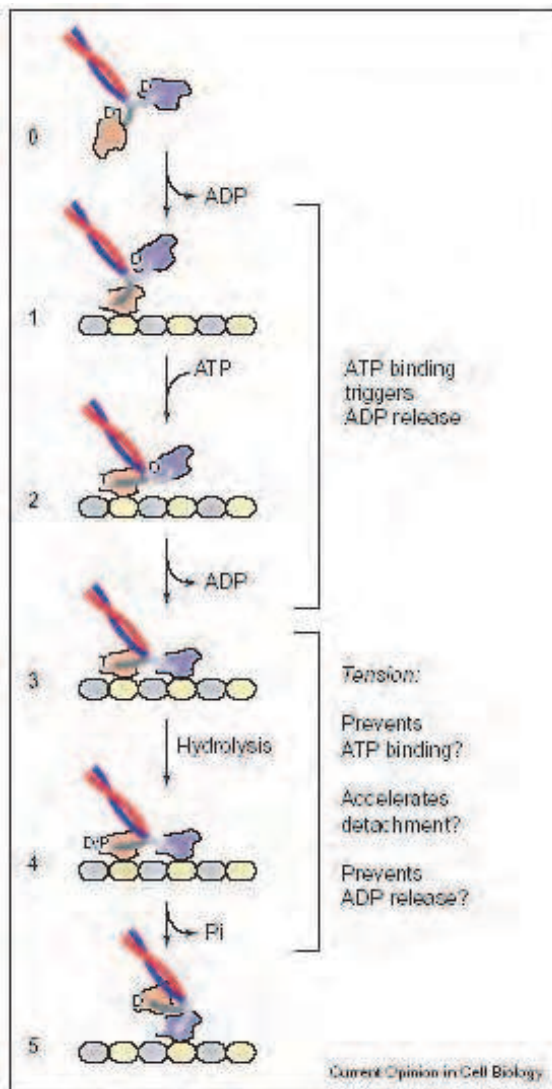


FIG. 2.6 – Détail du cycle ATPasique lors du pas de la kinésine. Etat 0 : l'ADP s'attache fortement aux deux têtes quand la kinésine n'est pas en contact avec un MT. Etat 1 : Une tête s'attache et relâche son ADP (devient la tête arrière), mais l'autre tête garde son ADP jusqu'à ce que la tête arrière fixe un ATP : Etat 2. Etat 3 : la tête avant s'accroche au MT et relâche donc son ADP. Etat 4 : l'ATP est hydrolysé en ADP + Pi. Etat 5 : le Pi est relâché et la tête arrière se détache. Voir aussi [Schief and Howard, 2001]. Différentes formes possibles de coopérativité entre les deux têtes sont aussi représentées : la première hypothèse consiste à dire que la fixation de l'ATP (état 2) entraîne le détachement de l'ADP de la tête avant. La deuxième hypothèse consiste à dire qu'une tension interne au moteur attaché par les deux têtes au MT pourrait empêcher l'attachement d'ATP sur la tête avant, accélérer le détachement de la tête arrière et empêcher le dernier ADP d'être relâché (état 3-4-5), d'après [Asbury, 2005].

- fait en moyenne **125 pas** en l'absence de force appliquée. Le temps pour faire un pas est une variable stochastique avec une certaine distribution, voir fig.2.12(a)) avant de se détacher du MT (une des deux têtes restant toujours attachée au MT). Cette propriété a été caractérisée par "gliding assays" ou "bead assays" (voir §B.2.1 suivant) dans des conditions de molécule unique [Howard et al., 1989, Block et al., 1990, Hackney, 1995]. Il y a autant de molécules d'ATP hydrolysées que de pas effectués et une distance moyenne d'environ $1 \mu m$ est parcourue. La kinésine-1 est donc un moteur moléculaire hautement **processif** et il a été établi que cette processivité nécessite la présence de deux têtes⁴ (la

⁴Ceci n'est vrai que pour la kinésine-1 : il existe une kinésine tronquée non-conventionnelle monomérique (donc avec un seul domaine moteur) et pourtant processive dans la famille KIF1A [Okada and Hirokawa, 1999, Okada et al., 2003]. Cette kinésine utilise en effet deux boucles dif-

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

dimérisation) [Hancock and Howard, 1998, Vale and Milligan, 2000].

- a une **vitesse moyenne** de l'ordre du **micron par seconde** à 1 mM d'ATP en l'absence de force appliquée⁵ [Howard et al., 1989, Block et al., 1990]. Comme la vitesse dépend du milieu (pH, salinité) dans lequel elle est mesurée, aucune valeur précise n'est donnée ici. On peut déduire de la mesure de vitesse et de la longueur de processivité un **temps de vie** de la liaison kinésine-microtubule de l'ordre de **1 s**, ainsi que la durée d'un cycle catalytique inférieure à 10 ms.

- met **"un pied devant l'autre"**. Plusieurs hypothèses du mécanisme de pas avaient été proposées ("hand-over-hand" symétrique ou asymétrique, ou "inchworm" [Hua et al., 2002, Asbury, 2005]) (fig. 2.7). Celui-ci a finalement été élucidé récemment grâce à deux expériences différentes et complémentaires : en marquant en fluorescence une des têtes de la kinésine et en suivant sa trajectoire dans des expériences de molécules uniques, un pas de 16 nm a été observé pour la tête [Yildiz et al., 2004] ; le mécanisme est donc de type "hand-over-hand". Le caractère asymétrique a été montré par [Hua et al., 2002] : la queue de la kinésine ne tourne pas pendant le mouvement, ce qui interdit le modèle type "hand-over-hand" symétrique où la rotation des têtes se ferait toujours dans le même sens. Finalement, la kinésine met un pied devant l'autre en alternant le sens de rotation.

- peut exercer au maximum une force moyenne égale à **6 pN**, appelée la **force d'arrêt** de la kinésine [Svoboda et al., 1994]. Cette force dépend peu de la concentration en ATP [Visscher et al., 1999] ; le détail de sa mesure est discuté §B.2.3. Son existence est liée à celle de la barrière d'énergie que la kinésine doit franchir pour faire un pas en avant. Comme cette barrière d'énergie dépend de la force rétrograde appliquée, mais que, en revanche, la barrière d'énergie pour faire un pas en arrière⁶ ne dépend pas de la force rétrograde appliquée, il existe une force maximale (égale à la force d'arrêt) telle que, pour cette force, la probabilité de faire un pas en avant ou un pas en arrière est égale. La kinésine a alors une vitesse nulle puisqu'elle fait autant de pas en avant qu'en arrière, et se décroche du MT [Nishiyama et al., 2002].

Pour terminer cette présentation de la kinésine et mieux comprendre à notre échelle comment marchent ces moteurs moléculaires, on peut multiplier par 10^7 la taille de la protéine : le diamètre passe de 10 nm à 10 cm, qui est par exemple la taille d'une petite voiture pour enfant (fig. 2.8).

Ensuite, sachant que le module d'Young de la protéine est du même ordre de grandeur que celui du Plexiglas [Howard, 2001], nous pouvons assimiler la protéine à la petite voiture en plastique pour les propriétés mécaniques. Si la kinésine avait cette taille macroscopique, pour qu'elle bouge dans un milieu avec le même nombre

férentes pour s'accrocher au MT [Nitta et al., 2004] ; son mouvement est essentiellement diffusif [Okada and Hirokawa, 2000].

⁵voir plus loin l'influence de la concentration en ATP (§B.2.3) et de la force appliquée (§B.2.4)

⁶La probabilité d'existence d'un pas en arrière est très faible à force nulle mais quelques uns ont été observés occasionnellement [Crevel et al., 1999]

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

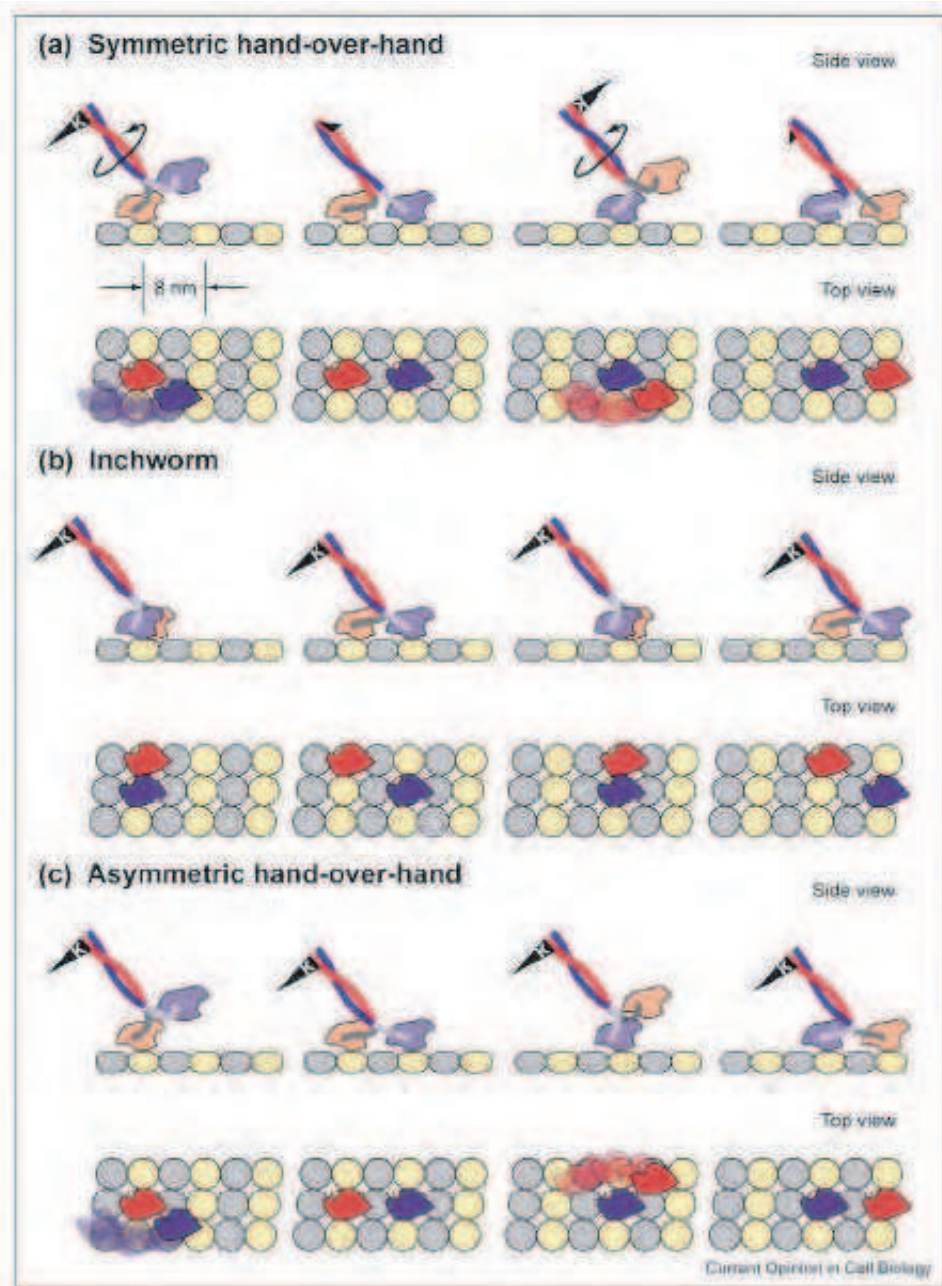


FIG. 2.7 – Les trois mécanismes possibles de pas : (a) "Hand-over-hand" symétrique (un pied devant l'autre), (b) "Inchworm" (en chenille), (c) "Hand-over-hand" asymétrique, d'après [Asbury, 2005]. Dans les mécanismes "hand-over-hand", les têtes ont un rôle équivalent alors que dans le modèle "inchworm", leurs rôles sont très différents.

de Reynolds (et donc le même type d'écoulement) que lors de son mouvement moléculaire, il faudrait aussi multiplier la viscosité du fluide dans lequel il se trouve par un facteur 10^7 , comme s'il se déplaçait dans du miel par exemple. En effet, le

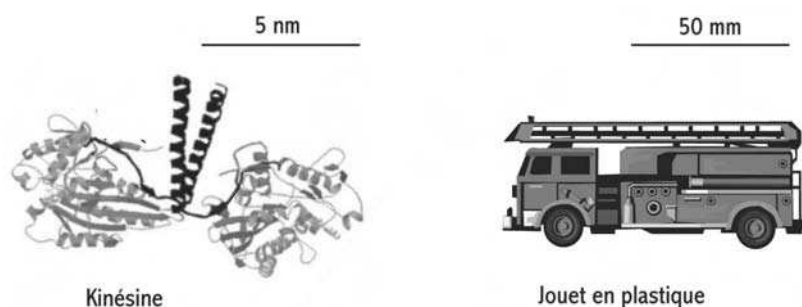


FIG. 2.8 – Comparaison d'échelles entre une kinésine et un jouet en plastique.

nombre de Reynolds dépend directement de la taille de l'objet et est donné par :

$$Re = \frac{\rho L \nu}{\eta} \quad (2.1)$$

où ρ représente la masse volumique du fluide (10^3 kg/m^3 dans d'une solution aqueuse); L , la taille de l'objet; ν , la vitesse de l'objet et η , la viscosité du milieu (10^{-3} Pa.s dans le cas d'une solution aqueuse). On peut supposer les deux vitesses égales à 1 m/s. Pour la protéine, la vitesse est celle de son changement de conformation : environ 1 nm en 1 ns (1 m/s) correspond au plus rapide changement de conformation possible [Howard, 2001].

Sachant que le moteur moléculaire a besoin d'une force de l'ordre de 1 pN pour induire le changement de conformation de l'ordre de 1 nm (ce qui correspond à une déformation de 10 %) qui est à la base de son mouvement, on peut se demander quelle serait la force équivalente est nécessaire à l'échelle macroscopique. Il faut donc calculer pour le jouet quelle force est nécessaire pour induire une déformation de 10 % (soit 10 mm) avec la même contrainte (force par unité de surface) que le moteur moléculaire. Pour le moteur, la contrainte est de : $10^{-12} \text{ N}/(10^{-9} \text{ m})^2 = 10^6 \text{ N/m}^2$, la force nécessaire pour le jouet est donc de : $10^6 * (10^{-2})^2 = 100 \text{ N}$, ce qui correspond au poids d'un objet de 10 kg! En réponse à ces forces, le moteur et le jouet se bougeront avec la même vitesse initiale 1 m/s, mais comme le moteur est beaucoup plus petit, son temps de relaxation sera beaucoup plus court que celui du jouet (100 ns contre 1 s respectivement). Si maintenant on calcule l'énergie nécessaire à la déformation du jouet, sachant qu'elle varie avec le volume de l'objet considéré, on trouve $(10^7)^3 = 10^{21}$ fois l'énergie d'hydrolyse d'une molécule d'ATP soit une centaine de joules ; ce qui rend compte de l'énergie développée par une kinésine pour faire un pas à notre échelle. Ces calculs sont tirés du cours de Joe Howard effectué aux Houches en juillet 2001. Le tableau 2.1 résume ces calculs.

B.2 Etude cinétique, influence de la force appliquée et de la concentration en ATP

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la kinésine a une vitesse moyenne de l'ordre du micron par seconde à 1 mM d'ATP et en l'absence de

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

| Quantité | Kinésine | Jouet en plastique |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| Dimension | 10 nm | 100 mm |
| Matériel (module d'Young) | Acide aminés (2 GPa) | Plastic (2 GPa) |
| Solution (viscosité) | Aqueuse (1 mPa.s) | Miel (10 kPa.s) |
| Vitesse | 1 m/s | 1 m/s |
| Nombre de Reynolds | 0.01 | 0.01 |
| Constante de temps | 100 ns | 1 s |
| Force | 1 pN | 100 N |
| Energie | 1-100x10 ⁻²¹ J | 1-100 J |

TAB. 2.1 – Mise à l'échelle des différents paramètres caractérisant le mouvement d'un jouet en plastique qui se déplacerait à notre échelle comme une kinésine à l'échelle moléculaire, d'après Howard, cours des Houches 20001.

force appliquée. Nous allons maintenant voir plus en détail comment ces deux paramètres (concentration en ATP et force appliquée) influent sur la cinétique du moteur. Cependant, il faut tout d'abord connaître les techniques expérimentales possibles pour mesurer la vitesse de la kinésine *in vitro* et dans différentes conditions.

B.2.1 "Bead assay" ou "gliding assay", deux techniques pour caractériser la vitesse de la kinésine *in vitro*.

L'étude des moteurs moléculaires a été révolutionnée par la mise au point d'expériences de motilité ("motility assays") dans lesquelles la mobilité le long de filaments de cytosquelette préassemblés de moteurs purifiés est reconstituée *in vitro*.

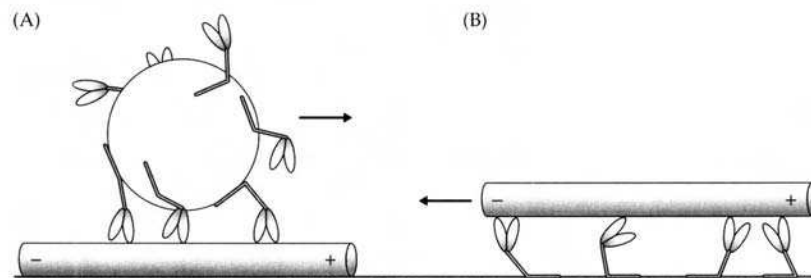


FIG. 2.9 – Etude de la motilité des moteurs *in vitro*. (A) "Bead assay". On étudie le mouvement d'une bille tirée par des kinésines-1 qui avancent (vers l'extrémité (+) du MT). (B) "Gliding assay". Le mouvement du MT (vers l'extrémité (-)) poussé par les kinésines-1 est détecté. Dessin tiré de [Howard, 2001]

- Dans le cas des "bead assays", les moteurs sont attachés sur des petites billes de

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

polystyrène (par adhésion non spécifique ou spécifique, suivant le "tag"⁷ que possède le moteur) de diamètre de l'ordre du micron (fig. 2.9 (A)). Les billes avancent alors, en présence d'ATP, le long de microtubules préalablement stabilisés et fixés sur la surface d'une lamelle de microscope. Il est possible de suivre la position de la bille avec une très grande précision spatiale [Gelles et al., 1988] et temporelle (25 ou 30 images par seconde pour des caméras classiques). Le développement des techniques de microscopie optique, et notamment du contraste interférentiel différentiel (DIC) avec rehaussement de contraste [Allen et al., 1981], a permis de visualiser un microtubule unique en même temps que la bille. Dans ce type d'expériences, il est possible de contrôler le nombre de kinésines par billes et la concentration en ATP dans le tampon utilisé ou d'imposer une force constante sur la bille grâce à une pince optique⁸ [Block et al., 1990, Visscher et al., 1999]. De plus, la mise au point d'un nouveau type de microscopie originale, la microscopie interférentielle à champ proche par onde évanescente progressive, a permis d'augmenter beaucoup la résolution temporelle de détection de la bille (de l'ordre de quelques dizaines de μs) en l'absence de force appliquée et ainsi de caractériser le détail du mouvement du moteur [Cappello et al., 2003, Dornier, 2005].

- Dans le gliding assay, la surface de la chambre est recouverte de kinésines et des microtubules stabilisés sont introduits. Comme dans le cas des "bead assays", il est possible de suivre le bout d'un microtubule et de faire des statistiques de vitesse en fonction de la concentration en ATP et de la densité de kinésines à la surface. Pour que les kinésines ne soient pas dénaturées en s'accrochant directement sur la surface de verre, il est possible de pré-traiter la surface avec de la tubuline et du cytochrome c. Cela permet de beaucoup diminuer la densité de kinésines jusqu'à 2 moteurs/ μm^2 , tout en continuant à voir un mouvement de microtubules; ils sont alors tirés par des moteurs uniques [Howard et al., 1989].

Plus récemment, grâce à l'augmentation de la sensibilité des outils d'observation, il a été possible d'observer directement une kinésine marquée par un fluorophore marcher sur un MT ou sur un axonème⁹ stabilisé. Des informations plus directes sur la kinésine (sans passer par une bille ou un MT) comme par exemple son taux de détachement ou la distance parcourue par une tête, ont ainsi été obtenues [Vale et al., 1996, Yildiz et al., 2004].

B.2.2 Influence de la densité de moteurs : la vitesse des billes ou MTs ne dépend pas du nombre de moteurs qui tirent.

Dans le cas des "bead assays", le nombre de kinésines par bille a été varié de 0,1 à 10 et aucun changement de vitesse n'a été observé à 1 mM d'ATP [Block et al., 1990,

⁷petite molécule attachée à la kinésine qui permet de la lier à autre molécule, exemple : biotine, Glutathione S Transferase (GST), hemagglutinine (HA), histidine

⁸voir §B.2.4

⁹sorte de faisceau de MTs

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

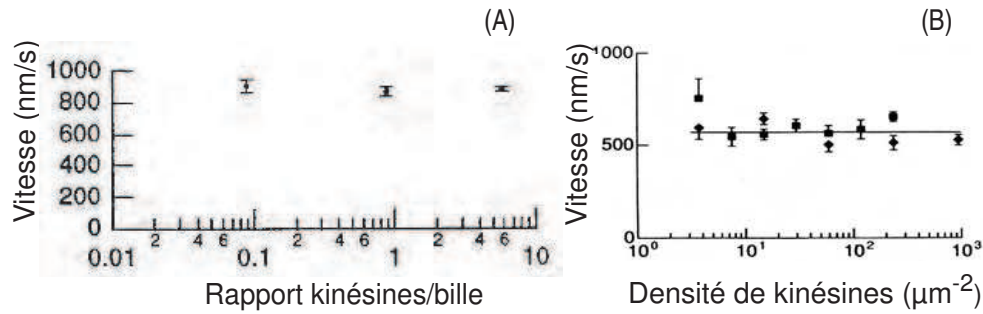


FIG. 2.10 – (A) Vitesse en nm/s de la bille en fonction du nombre de kinésines par bille ("bead assay"), d'après [Coy et al., 1999b]. (B) Vitesse en nm/s du bout d'un MT ("gliding assay") en fonction de la densité de la kinésine à la surface de la chambre (en μm^{-2}), d'après [Howard et al., 1989]

Coy et al., 1999b], voir figure 2.10(A). De façon similaire dans les gliding assays, la vitesse des MTs reste constante (à 1 mM d'ATP) lorsque la densité de kinésines à la surface de la chambre augmente (fig. 2.10(B)), et ne dépend pas non plus de la longueur des MTs [Howard et al., 1989]. Ces observations montrent que lorsque l'ATP n'est pas limitant (voir §B.2.3 suivant), les kinésines qui tirent en même temps n'interfèrent pas et avancent toutes à la même vitesse (à 1 mM ATP en l'absence de force extérieure); cette vitesse qu'on appellera V_0 par la suite est caractéristique du moteur étudié, mais dépend légèrement du tampon dans laquelle on la mesure. Nous avons également mesuré par "bead assays" la vitesse de la kinésine-1 que nous avons utilisée dans nos expériences de formation de tubes de membrane, voir ch.4 §B.1.

Ce qui change lorsque l'on augmente la densité de moteurs qui tirent simultanément, sur une bille ou un MT, c'est la longueur sur laquelle une bille ou un MT peut avancer sans se détacher. Lorsqu'il n'y a qu'un seul moteur qui tire, cette longueur représente la longueur de processivité de la kinésine (environ $1 \mu\text{m}$, voir les propriétés physiques de la kinésine-1). Elle est aussi une caractéristique du type de kinésine utilisé. En revanche, quand le nombre de moteurs qui tirent simultanément augmente, il est possible qu'un moteur se détache et que les autres continuent à tirer (avec la même vitesse). Les moteurs se relaient et la bille (ou le MT) peut avancer sur plusieurs microns.

B.2.3 Influence de la concentration en ATP : la vitesse saturée à 1 mM d'ATP.

Les deux types d'étude de la motilité ont donné le même résultat en ce qui concerne la variation de la vitesse d'une kinésine unique en fonction de la concentration en ATP. Cette vitesse est très faible (quelques dizaines de nm/s) pour des faibles concentrations en ATP (de l'ordre du μM), et augmente rapidement avec la

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

concentration en ATP jusqu'à une concentration saturante de l'ordre du mM (fig. 2.11). Lorsque qu'il y a assez de molécules d'ATP en solution pour que leur diffusion ne soit plus limitante, la vitesse de la kinésine est limitée par la vitesse d'hydrolyse de l'ATP [Svoboda et al., 1993]. La concentration saturante d'ATP, 1 mM, correspond à la valeur mesurée dans le cytoplasme des cellules vivantes; c'est à cette concentration que la kinésine est la plus efficace : elle avance vite et longtemps.

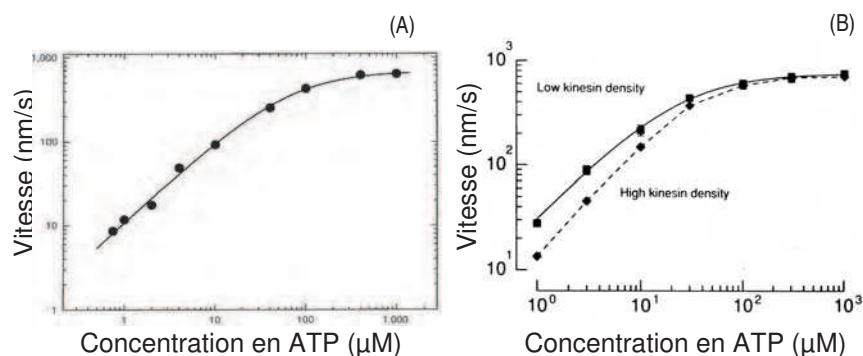
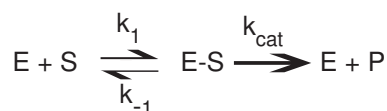


FIG. 2.11 – (A) Vitesse (en nm/s) de la bille en fonction de la concentration en ATP (en μM), d'après [Schnitzer and Block, 1997]. (B) Vitesse (en nm/s) du bout du MT ("gliding assay") en fonction de la concentration en ATP (en μM) pour une faible concentration surfacique de kinésine (ligne continue) et pour une forte concentration en kinésine (ligne pointillée), d'après [Howard et al., 1989].

Les courbes représentées à la figure 2.11(B) représentent la variation de la vitesse de MTs en "gliding assay" dans deux cas : quand la concentration surfacique de kinésines est faible, et quand la concentration surfacique est élevée. On remarque que la deuxième courbe est en dessous de la première; ce qui signifie que pour une concentration en ATP non-saturante donnée, les kinésines qui sont attachées mais qui ne tirent pas le microtubule (parce qu'elles manquent d'ATP) freinent les kinésines qui tirent effectivement le microtubule. C'est un comportement collectif des kinésines intéressant à remarquer, il peut être mis en parallèle avec les résultats présentés en annexe B sur la statistique de vitesses de billes dans des "bead assays" effectués sur des microtubules déjà encombrés par des kinésines.

La kinésine est une enzyme (E) qui consomme de l'ATP (substrat S) pour former de l'ADP (produit P). Il a été observé expérimentalement que la réaction chimique entre ces différents composants suit la cinétique de Michaelis-Menten [Hackney, 1994, Visscher et al., 1999, Block et al., 2003] représentée de façon schématique par l'équation chimique suivante :



B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

où k_1 , k_{-1} et k_{cat} sont les constantes cinétiques. k_{cat} est généralement appelée la constante catalytique et détermine approximativement le nombre de molécules de substrat qui réagissent avec une enzyme par seconde lorsque l'enzyme est saturée. Rapidement, la réaction atteint un état stationnaire où la concentration en complexes enzyme-substrat (E-S) est constante. On peut alors en déduire par un calcul de cinétique chimique l'expression du taux d'apparition du produit (ADP) appelé v , qui est égal au taux de consommation de substrat (donc d'ATP). Or, nous avons vu plus haut qu'à chaque molécule d'ATP consommée correspond un pas de taille ($d=8$ nm) de la kinésine [Coy et al., 1999b]. On peut donc obtenir la vitesse de la kinésine (V) en fonction de la concentration en ATP en multipliant simplement le taux d'apparition du produit v par d . On a :

$$V = d.v = d.k_{cat} \frac{[ATP]}{[ATP] + K_m} = V_{max} \frac{[ATP]}{[ATP] + K_m} \quad (2.2)$$

où $V_{max} = k_{cat} \cdot d$ représente la vitesse maximale à saturation et K_m la constante de Michaelis-Menten ($K_m = (k_{-1} + k_{cat})/k_1$ [Alberts et al., 2002]). k_{cat}/K_m représente l'efficacité catalytique et K_m correspond à la concentration en ATP telle que la vitesse est égale à la moitié de la vitesse à saturation. Ainsi, $[ATP] \ll K_m$ correspond au cas où l'ATP est limitant et $[ATP] \gg K_m$ au cas de la saturation. L'ajustement de la courbe fig. 2.11(A) donne les valeurs de K_m apparente, $K_m = 62 \pm 5 \mu M$, et de V_{max} , $V_{max} = 680 \pm 31 \text{ nm/s}$ [Schnitzer and Block, 1997]. A partir de la valeur de V_{max} , on peut aussi remonter à la constante catalytique k_{cat} : $k_{cat} \simeq 91 \text{ s}^{-1}$ [Svoboda et al., 1994], ce qui est en bon accord avec le nombre de pas que peut faire une kinésine avant de se détacher à saturation en ATP (une centaine, voir les propriétés physiques).

La force de freinage hydrodynamique appliquée sur la bille ou sur le MT est négligeable par rapport aux forces typiques des kinésines (0.14 pN pour un MT de 20 μm de long, encore moins pour une bille de l'ordre du micron) [Hunt et al., 1994] ; c'est pourquoi on parle de vitesse mesurée en l'absence de force appliquée sur la bille ou le MT. Nous allons maintenant voir l'influence de la force sur la vitesse de la kinésine.

B.2.4 Influence de la force appliquée sur la kinésine : la vitesse diminue et s'annule à -6 pN

Pour pouvoir appliquer une force sur un moteur moléculaire sans le détériorer, une possibilité est d'utiliser une pince optique qui piège une bille au point focal d'un faisceau laser focalisé. Si la bille est en plus attachée à une kinésine en condition de molécule unique (faible rapport kinésine par bille), et avance le long d'un MT, alors la force appliquée à la bille est transmise au moteur. Quand la bille s'éloigne du centre du piège (parce qu'elle est tirée par un moteur par exemple), le piège exerce sur elle une force de rappel élastique, comme un ressort. On peut alors, à partir de la position de la bille par rapport au piège, remonter à la force appliquée sur la bille (fig. 2.12 tirée de [Visscher et al., 1999]), et à la variation de la vitesse en fonction

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

de cette force.

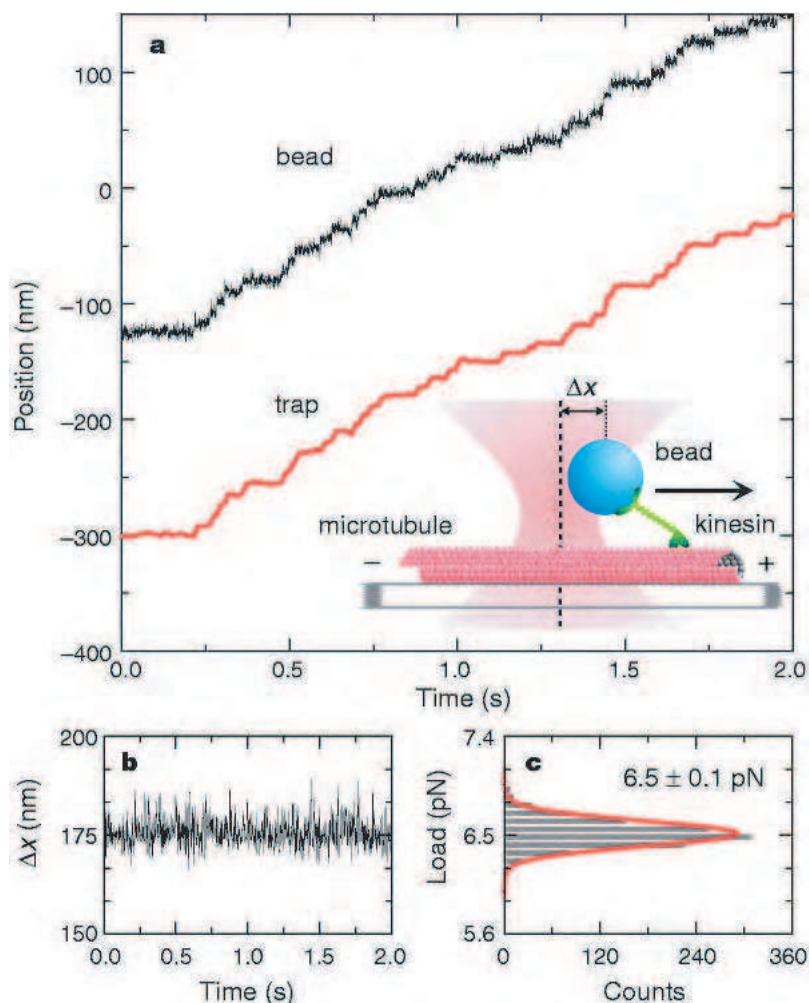


FIG. 2.12 – (a) Schéma expliquant le principe d’une mesure de force appliquée avec une pince optique : un moteur moléculaire avançant le long d’un MT est attaché à une bille piégée dans une pince optique. La position de la bille par rapport au piège Δx permet de remonter à la force appliquée sur le moteur. Le piège suit la position de la bille grâce à un système de rétroaction en force. Un exemples d’acquisitions obtenues pour la position de la bille (“bead”) et du piège (“trap”) est représenté : des pas de 8 nm sont visibles et le temps entre les pas est stochastique, illustrant la stochasticité du moteur étudié (fréquence d’acquisition : 20 kHz, $\Delta x=175$ nm, 2 mM d’ATP) ; (b) Écart entre les positions de la bille et du piège Δx dans l’acquisition (a) ; (c) Histogramme de la force appliquée obtenu à partir des déplacements représentés au (b) en tenant compte de la constante de raideur du piège (0.037 pN/nm). La ligne rouge continue est un fit gaussien qui donne la force appliquée sur la bille : $6,5 \pm 0,1$ pN, d’après [Visscher et al., 1999].

La mise au point d’une pince optique très performante avec une rétroaction qui permet d’appliquer une **force constante**, dans toutes les directions, sur une

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

bille et de la suivre dans son mouvement [Lang et al., 2002], a permis de faire des mesures de vitesse très précises¹⁰ et sans calcul correctif pouvant introduire des erreurs¹¹ (contrairement au cas où la pince optique est statique et sans rétroaction [Svoboda et al., 1994]). Les mesures ont été faites à différentes forces, dans différentes directions et à différentes concentrations en ATP. Une partie des résultats est représentée fig. 2.13.

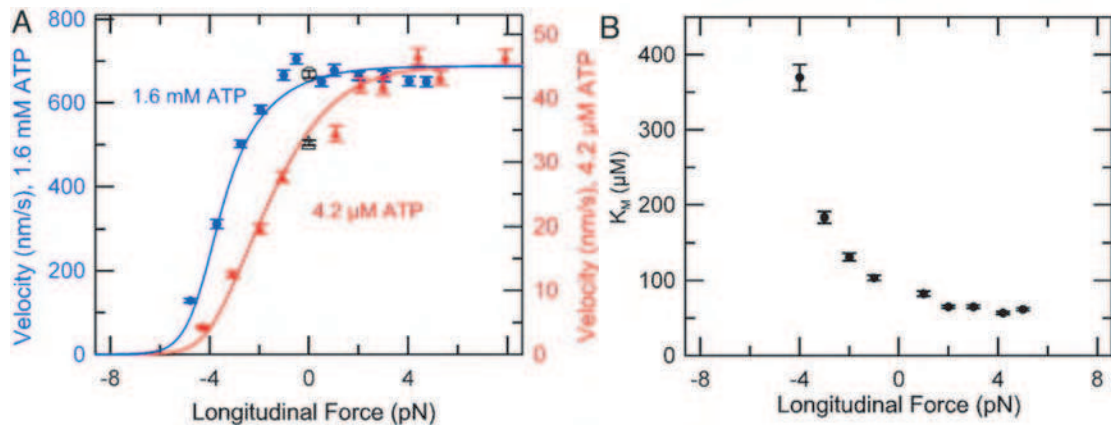


FIG. 2.13 – (A) Courbes donnant la vitesse de la bille en fonction de la force longitudinale appliquée (le long du MT). Les forces négatives correspondent aux forces dans le sens inverse du mouvement et les forces positives sont celles dans le sens du mouvement. La courbe bleue (la plus haute) a été mesurée à 1,6 mM d’ATP, donc à saturation, et la courbe rouge a été mesurée à 4.2 μM d’ATP (en condition ATP limitante). (B) Courbe donnant la constante de Michaelis-Menten en fonction de la force longitudinale appliquée, d’après [Block et al., 2003].

Lorsqu’une force longitudinale (dans la direction du microtubule) est appliquée sur la bille dans la direction du déplacement des moteurs (ici $F > 0$), on remarque sur la fig. 2.13 que la vitesse est très peu affectée par la force. La force vers l’avant n’aide donc pas la kinésine à avancer plus vite, contrairement à ce qui avait été publié précédemment [Coppin et al., 1996]. Lorsque la force longitudinale est appliquée dans le sens opposé au mouvement, on remarque que pour les deux concentrations en ATP, la vitesse diminue en fonction de la force appliquée et s’annule pour une valeur comprise **entre 5 et 8 pN**. Cette valeur, généralement prise égale à 6 pN, correspond à la **force d’arrêt** de la kinésine (“stall force” appelée F_S par la suite). La variation de la force d’arrêt avec la concentration en ATP a été mesurée précisément dans [Vischer et al., 1999]. Les valeurs obtenues avec les pinces optiques sont en bon accord avec les résultats obtenus par d’autres méthodes : [Meyhofer and Howard, 1995]

¹⁰L’utilisation d’une diode à quatre quadrants a permis de beaucoup augmenter la résolution spatiale (subnanométrique) par rapport aux détectations avec une caméra classique, et l’utilisation de fréquences d’acquisition élevées permet d’augmenter la résolution temporelle en dessous de la milliseconde.

¹¹pour déterminer la position relative du moteur par rapport à celles de la bille et de la platine du microscope

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

ont mesuré la force d'arrêt en utilisant une microfibre pour exercer une force calibrée sur un MT tiré par une kinésine (5,4 pN); [Hunt et al., 1994] en appliquant une force visqueuse croissante et mesurant la vitesse de microtubules tirés par une kinésine unique dans un "gliding assay" (une extrapolation de la force d'arrêt donne 4,5 pN) et [Gittes et al., 1996] en mesurant la courbure d'un microtubule fixé d'un côté et tiré par une kinésine unique dans une sorte de gliding assay modifié (6 pN).

Sachant qu'une kinésine peut produire une force maximale de 6 pN sur une distance de 8 nm, on en déduit que le travail maximal qu'elle peut effectuer sur un pas est 48 pN.nm (= 12 $K_B T$), ce qui correspond environ à la moitié de l'énergie délivrée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP dans le milieu cellulaire (20-25 $K_B T$). La force d'arrêt correspond donc à 50% de la force thermodynamique (12,5 pN = 100 pN.nm/8nm) qui correspond à la force maximale que l'on peut obtenir si toute l'énergie chimique est transformée en énergie mécanique [Howard, 2001] (ce qui concrètement n'est jamais possible); la kinésine est donc bien un moteur hors équilibre thermodynamique.

D'autre part, le fait que la vitesse de la kinésine dépende de la force de freinage appliquée sur elle corrobore le fait que les constantes cinétiques décrivant l'hydrolyse de l'ATP pendant le pas dépendent aussi de la force appliquée. C'est ce qui est représenté fig. 2.13(B) : la constante K_m qui représente principalement l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat augmente beaucoup avec la force de freinage. La force appliquée diminue donc beaucoup l'affinité de la kinésine avec l'ATP. Ceci confirme qu'il existe bien un couplage mécano-chimique entre le cycle d'hydrolyse de l'ATP et le changement de conformation mécanique de la kinésine qui donne lieu au pas. Le détail de ce couplage reste encore incompris, notamment à quelle(s) étape(s) la force est générée¹² et quel est le mécanisme de coopérativité entre les deux têtes, même si quelques hypothèses sont en cours de validation (voir §B.1.3) [Endow, 2003, Cross, 2004].

B.3 Taux de détachement et d'attachement d'une kinésine sur un microtubule

B.3.1 Taux de détachement d'un microtubule

Nous avons vu auparavant que la kinésine est un moteur processif qui fait en moyenne une centaine de pas avant de se détacher. On peut décrire le taux de détachement représenté fig. 2.14(A) par une fréquence égale à l'inverse du temps moyen que la kinésine passe sur le microtubule. Ce taux, qu'on appellera par la suite k_u^0 (u pour "unbinding", 0 signifie en l'absence de force appliquée) est donc égal au rapport entre la vitesse moyenne de la kinésine et la distance moyenne parcourue en l'absence de force L_0 :

$$L_0 = \frac{V_0}{k_u^0} \quad (2.3)$$

¹²si la force est générée en une fois, le modèle s'appelle "power stroke"

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

Nous avons vu que typiquement, la vitesse d'une kinésine est $V_0 = 0,6 \mu m/s$ et la distance moyenne de parcours de l'ordre du micron. k_u^0 est donc de l'ordre de $0,6 s^{-1}$; ce taux a été mesuré plus précisément par [Vale et al., 1996], il est égal à $k_u^0 = 0,42 \pm 0,03 /s$.

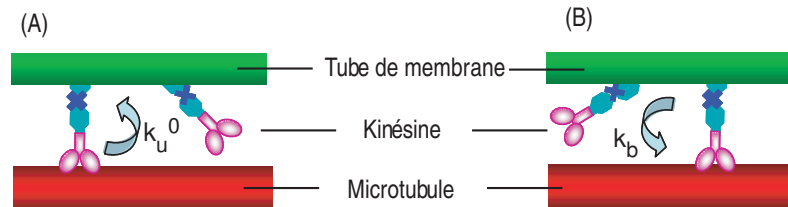


FIG. 2.14 – (A) Schéma décrivant le taux de détachement d'une kinésine marchant le long d'un MT et attachée le long d'un tube de membrane; aucune force n'est appliquée sur elle comme dans nos expériences décrites aux chapitres suivants. (B) Schéma décrivant le taux d'attachement d'une kinésine attachée le long d'un tube de membrane sur un MT.

B.3.2 Taux d'attachement sur un microtubule

Ce taux, appelé k_b , correspond à la fréquence d'attachement d'une kinésine sur un microtubule (fig. 2.14(B)). Il n'est pas tout à fait symétrique au précédent : le taux de détachement décrit le passage d'un état 1D bien défini (la kinésine avance à la vitesse V_0 le long d'un microtubule) vers un état à 3D quand la kinésine passe dans le tampon ou à 2D quand la kinésine reste accrochée à une membrane ou au cargo, ce qui est les cas dans nos expériences *in vitro*, comme dans le trafic intracellulaire. L'attachement, en revanche, correspond au passage d'un état de diffusion à 3D ou 2D à un état à 1D : on comprend que, dans ce cas, la concentration en kinésine à 3D ou à 2D ainsi que la façon dont elle diffuse va influencer le taux d'attachement. Ce n'est donc pas une grandeur caractéristique de la kinésine mais une grandeur qui dépend de la géométrie du système. C'est pourquoi il existe très peu de littérature sur la mesure de ce coefficient. Nous verrons dans le dernier chapitre que nos expériences permettent de mesurer le taux d'attachement des kinésines dans une géométrie tubulaire, mais qu'il n'est pas possible de le comparer à d'autres valeurs puisque ce n'est pas une grandeur intrinsèque du moteur. Par un petit calcul géométrique, on pourra cependant calculer la probabilité d'attachement de la kinésine quand elle est à proximité immédiate du MT ; ce sera au contraire une grandeur intrinsèque.

B.3.3 Influence de la force appliquée : le taux de détachement augmente exponentiellement

Le réaction de dissociation de la kinésine du microtubule fait intervenir un changement de la conformation de la protéine, comme pendant le pas. On comprend donc

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

que la force appliquée aura une influence sur la cinétique de la réaction de dissociation. Le profil de la réaction est représenté de façon schématique par la courbe continue figure 2.15(A) (en l'absence de force appliquée). La coordonnée de réaction, qui mesure l'avancement de la réaction, correspond de façon naturelle à la taille de la protéine dans la direction de la force. On remarque que pour passer de l'état d'équilibre (1) à l'état d'équilibre (2), la protéine doit passer une barrière d'énergie, dont le sommet correspond à l'état de transition (instable) entre les deux états d'équilibre. La distance entre l'état (1) et l'état de transition se note a . Lorsqu'une force est appliquée dans la direction opposée au mouvement de la kinésine, le profil est déplacé vers le profil pointillé : l'état (2) dissocié est plus stable et l'état de transition est abaissé de l'énergie $F.a$ si F est l'intensité de la force appliquée et a , définie comme précédemment.

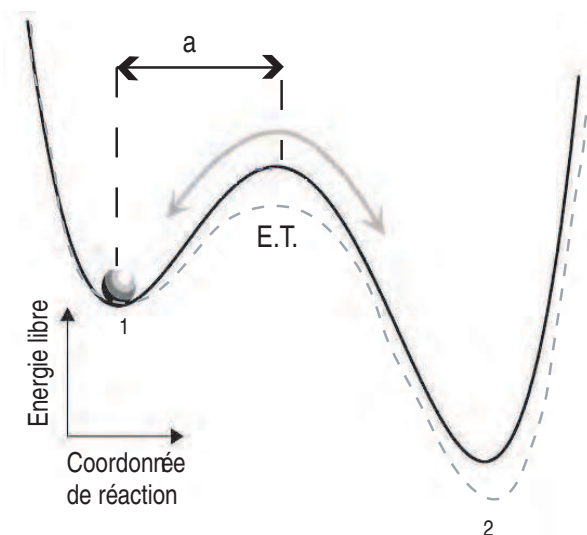


FIG. 2.15 – Schéma montrant le profil d'énergie libre (courbe continue) lors du détachement de la kinésine du MT en fonction d'une coordonnée de réaction et en l'absence de force appliquée. L'état (1) correspond à l'état lié au MT et l'état (2) à l'état non lié. La distance a correspond à la distance entre l'état (1) et l'état de transition (E.T.). Le déplacement de la courbe d'énergie avec une force appliquée dans le sens inverse à celui du mouvement de la kinésine est représenté en pointillé. La force va tendre à déstabiliser l'état (1) alors que l'état (2) est stabilisé.

De plus, comme le changement de conformation lors de la dissociation kinésine-MT est limité par la diffusion, il est régi par la théorie de Kramers [Kramers, 1940]. Le taux de détachement k_u va dépendre fortement de la force F appliquée dans le sens inverse du mouvement et de la distance a , ce que décrit l'équation suivante :

$$k_u(F) = k_u^0 \exp\left(\frac{F a}{K_B T}\right) \quad (2.4)$$

où K_B est la constante de Boltzmann et T la température. Par exemple, pour une force appliquée égale à la moitié de la force d'arrêt (3 pN), le taux de détachement vaut 2,6 fois k_u^0 soit $1,1 \text{ s}^{-1}$. Pour $F = F_S$, $k_u = 7k_u^0$, c'est pour cette raison qu'il est très difficile d'observer un pas en arrière de la kinésine puisqu'elle se détache avant.

Le paramètre a est obtenu en ajustant la courbe qui donne la longueur de processivité, à une concentration en ATP donnée, en fonction de la force appliquée ((fig. 2.16(B)). L'équation utilisée pour l'ajustement est du type cinétique de Michaelis-Menten (comme dans l'équation 2.2, voir fig. 2.16(A)) en tenant compte de la dépen-

B. Les kinésines conventionnelles, moteurs moléculaires qui transportent les cargos

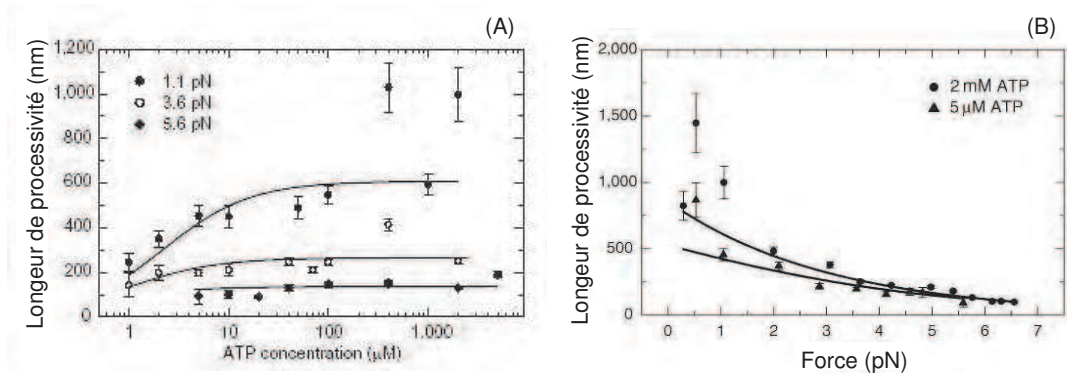


FIG. 2.16 – (A) Longueur de processivité en fonction de la concentration en ATP pour différentes forces appliquées dans le sens inverse du mouvement, d’après [Schnitzer et al., 2000]. Elle suit la cinétique de Michaelis-Menten. (B) Distance moyenne parcourue par une kinésine le long d’un microtubule (longueur de processivité) en fonction de la force longitudinale appliquée dans le sens inverse du mouvement à 2 mM d’ATP (saturation, disque) et à 5 μ M d’ATP (triangle). Les courbes d’ajustement représentées en ligne continue permettent de remonter à la valeur de la longueur caractérisant la potentiel : $a=1,3 \pm 0,1$ nm, d’après [Schnitzer et al., 2000].

dance exponentielle des constantes cinétiques avec $F \cdot a$ (eq. 2.5) ; elle fait intervenir trois paramètres dont a .

$$L(F) = \frac{8nm[ATP] \cdot A \cdot e^{-Fa/K_B T}}{[ATP] + B(1 + A \cdot e^{-Fa/K_B T})} \quad (2.5)$$

La valeur obtenue pour a est de $1,3 \pm 0,1$ nm [Schnitzer et al., 2000], valeur que l’on utilisera par la suite. Il est aussi possible d’extraire la valeur de a à partir des résultats expérimentaux du groupe de Vale [Thorn et al., 2000]. En ajustant les données du taux de détachement en fonction de la force rétrograde appliquée avec l’équation 2.4 (connaissant k_u^0) et en pondérant l’ajustement par les erreurs sur les données, on trouve : $a=1,4 \pm 0,2$ nm, en bon accord avec les résultats obtenus par le groupe de Block (fig. 2.17).

On peut remarquer enfin que l’action d’une force sur une kinésine lors du changement de conformation pendant un pas fait aussi apparaître un paramètre qui a l’échelle du nanomètre. Ce paramètre a été mesuré à partir de courbes de vitesse en fonction de la force appliquée [Schnitzer et al., 2000] et est différent du paramètre a précédent (3,7 nm contre 1,3 nm respectivement). La mobilité (donc le pas) et la processivité (donc le détachement) de la kinésine font donc bien intervenir des mécanismes différents.

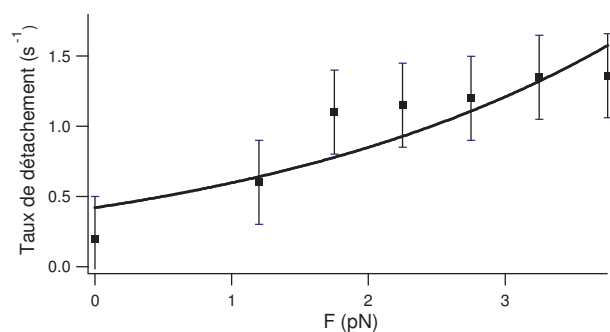


FIG. 2.17 – Taux de détachement d'une kinésine d'un MT en fonction de la force rétrograde appliquée, d'après [Thorn et al., 2000]. L'ajustement des données avec l'équation 2.4 permet d'obtenir $a=1,4 \pm 0,2$ nm.

B.3.4 Influence de la concentration en ATP sur le taux de détachement

Comme la longueur de processivité suit la cinétique de Michaelis-Menten, elle augmente avec la concentration en ATP puis sature, comme la vitesse (fig.2.11). Comme elle est donnée par une formule similaire à l'équation 2.3 : $L = V/k_u$ dans le cas général (avec force appliquée), on en déduit que le taux de détachement dépend peu de la concentration en ATP. Ainsi, quand l'ATP est limitant, le temps durant lequel la kinésine est attachée au MT est du même ordre de grandeur qu'à saturation en ATP, en revanche le nombre de pas effectués est plus faible et le temps écoulé entre chaque pas est plus grand : la kinésine est bloquée dans la position attachée en attendant qu'un ATP se lie. La conformation de la kinésine pendant l'attente d'un ATP reste controversée : une tête attachée si on suppose que l'arrivée de l'ATP entraîne l'attachement de la deuxième tête [Kawaguchi and Ishiwata, 2001, Asbury, 2005], ou bien deux têtes attachées comme ce qui a été suggéré par les expériences de Yildiz [Yildiz et al., 2004]. La réponse à cette question demande une amélioration de la résolution temporelle des expériences faites en molécule individuelle.

B.3.5 Influence de la présence de MAPs

Les MAPs¹³ sont des protéines associées aux MTs, elles se lient à eux et changent leurs propriétés. Elles peuvent notamment les stabiliser contre le désassemblage et intervenir dans leur interaction avec d'autres composants cellulaires [Alberts et al., 1995]. Il a été montré par exemple que les protéines Tau et MAP2c peuvent interagir avec les kinésines qui s'accrochent sur les MTs. Elles diminuent leur fréquence d'attachement, sans pour autant changer leur longueur de processivité ni leur vitesse ; ce qui laisse penser que MAP2c et Tau peuvent intervenir dans la régulation de la fonction de la kinésine au niveau de l'attachement, mais pas pendant le mouvement [Seitz et al., 2002]. Ces observations ont aussi été faites en marquant la kinésine en fluorescence et en suivant les événements d'accrochage et de mouvement au niveau de molécules individuelles. Ces observations peuvent expliquer pourquoi, lorsque l'on fait des "bead assays" en utilisant des microtubules stabilisés contenant de la tubuline contenant des MAPs, la proportion de billes qui s'attachent sur les MTs est beaucoup plus faible que lorsque l'on utilise des MTs composés de tubuline pure, dans des conditions expérimentales similaires (voir ch4

¹³Microtubule Associated Proteins

§A).

B.4 Modèle à deux états des moteurs moléculaires

En parallèle aux études structurales et cinétiques faites sur les moteurs moléculaires, l'équipe de théorie du groupe de Jacques Prost à l'Institut Curie a mis au point un modèle simple pour comprendre la physique de ces moteurs et plus particulièrement déterminent les ingrédients minimaux pour générer un mouvement. Ceci a conduit au modèle du "cliquet brownien" (Brownien ratchet) qui est une généralisation du "cliquet thermique" de Feynman [Feynman et al., 1963] non applicable aux moteurs moléculaires. En effet, comme une inhomogénéité de température disparaît à l'échelle d'une dizaine de nanomètres en un temps de l'ordre de la microseconde, soit dix mille fois plus petit que la durée d'un cycle ATPasique correspondant à un pas (voir plus haut), on comprend qu'une distribution périodique de la température n'est pas adaptée pour décrire un moteur, même si elle est capable de prévoir un mouvement macroscopique de celui-ci [Landauer, 1988].

Le "cliquet brownien" consiste en une particule isotherme qui effectue des transitions stochastiques entre deux états [Rousselet et al., 1994, Jülicher et al., 1997] (fig. 2.18). Dans l'état 1, la particule est plongée dans le potentiel périodique asymétrique; cet état correspond au cas où le moteur est "lié" au filament (MT dans notre cas). Dans l'état 0, elle est libre de diffuser par mouvement brownien, ce qui correspond à l'état "détaché".

La particule effectue des transitions stochastiques entre les deux états avec des taux déterminés $r_{0 \rightarrow 1}$ et $r_{1 \rightarrow 0}$. Si $l_1 < l_2$ (voir 2.18), la probabilité que la particule tombe dans le puits de potentiel de droite est grande, tandis qu'il existe seulement une faible probabilité de tomber dans le puits de gauche. La particule dérive donc vers la droite. Cependant, si le système est à l'équilibre thermodynamique, la brisure de symétrie spatiale n'est pas suffisante pour expliquer le mouvement de la particule. Il faut aussi une brisure de symétrie temporelle qui a lieu grâce à la réaction chimique d'hydrolyse de l'ATP, le maintien hors d'équilibre étant assuré par un apport sans limite d'ATP. Le mouvement brownien est alors redressé et la particule se déplace en l'absence de gradient de potentiel macroscopique.

Le modèle du "cliquet brownien" peut s'adapter à toutes sortes de moteurs moléculaires puisqu'il ne tient pas compte de la structure microscopique de la protéine étudiée. Seules les propriétés générales de vitesse et de force sont extraites. Il permet de plus d'utiliser les méthodes de la physique statistique pour étudier les propriétés d'une collection de moteurs et notamment leur coopérativité [Jülicher and Prost, 1995, Badoual et al., 2002].

C Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

L'existence des membranes cellulaires est connue depuis plus d'une centaine d'années. Étudiées depuis par à la fois des physiciens, des chimistes et des biologistes,

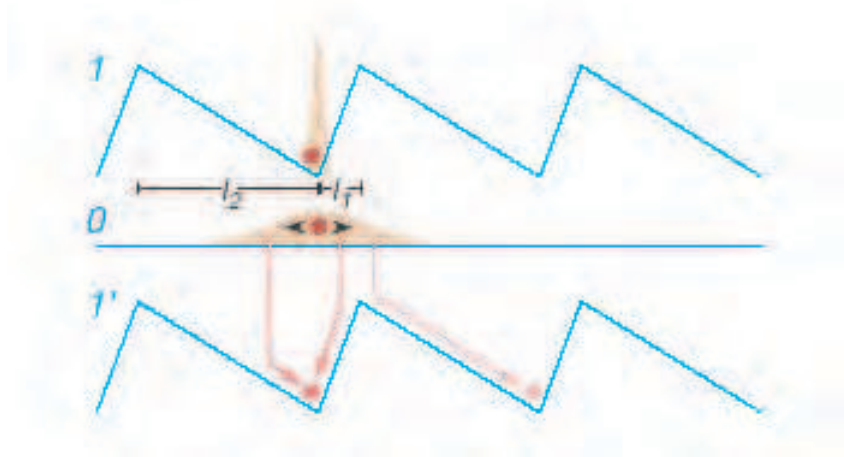


FIG. 2.18 – Mouvement d’une particule brownienne qui transite entre deux états. Dans l’état 1, la particule est plongée dans un potentiel périodique et asymétrique. Quand elle se trouve au minimum du potentiel, elle effectue une transition stochastique vers l’état 0 (état purement diffusif) avec un taux $r_{1 \rightarrow 0}$. Une fois dans l’état 0, la position de la particule est caractérisée par une distribution gaussienne (indiquée en orange). Quand la particule effectue une transition stochastique vers l’état 1’ (égal à l’état 1) avec un taux $r_{0 \rightarrow 1}$, la probabilité qu’elle effectue un saut vers la droite est plus grande que la probabilité de faire un saut vers la gauche. Au cours du temps, la particule effectue donc un mouvement net vers la droite. Extrait de [Jülicher and Duke, 2000].

leur structure et leurs propriétés ont été mises à jour petit petit, grâce aux développements des outils d’optique, de microscopie électronique, rayon X, RMN, etc. La chronologie représentée figure 2.19, d’après [Edidin, 2003], fait le point sur les découvertes principales depuis un siècle et permet d’introduire cette partie qui traite des membranes biologiques puis artificielles.

C.1 Les membranes biologiques

C.1.1 Fonctions dans la cellule

Les membranes ont un rôle essentiel dans la vie des cellules. Que ce soit la membrane plasmique, qui entoure la cellule, ou les membranes des différents organites intracellulaires, elles permettent toutes de maintenir les différences indispensables entre le milieu interne à la membrane et le milieu externe (par exemple en ions, ATP ou autres solutés). Ce maintien peut s’effectuer de façon passive grâce à leur perméabilité limitée aux ions ou grâce à l’action de certaines protéines intramembranaires qui consomment de l’énergie pour entretenir un gradient en certains types d’ions. Ce caractère actif des membranes de cellules vivantes implique que ces membranes sont ”hors équilibre thermodynamique”.

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

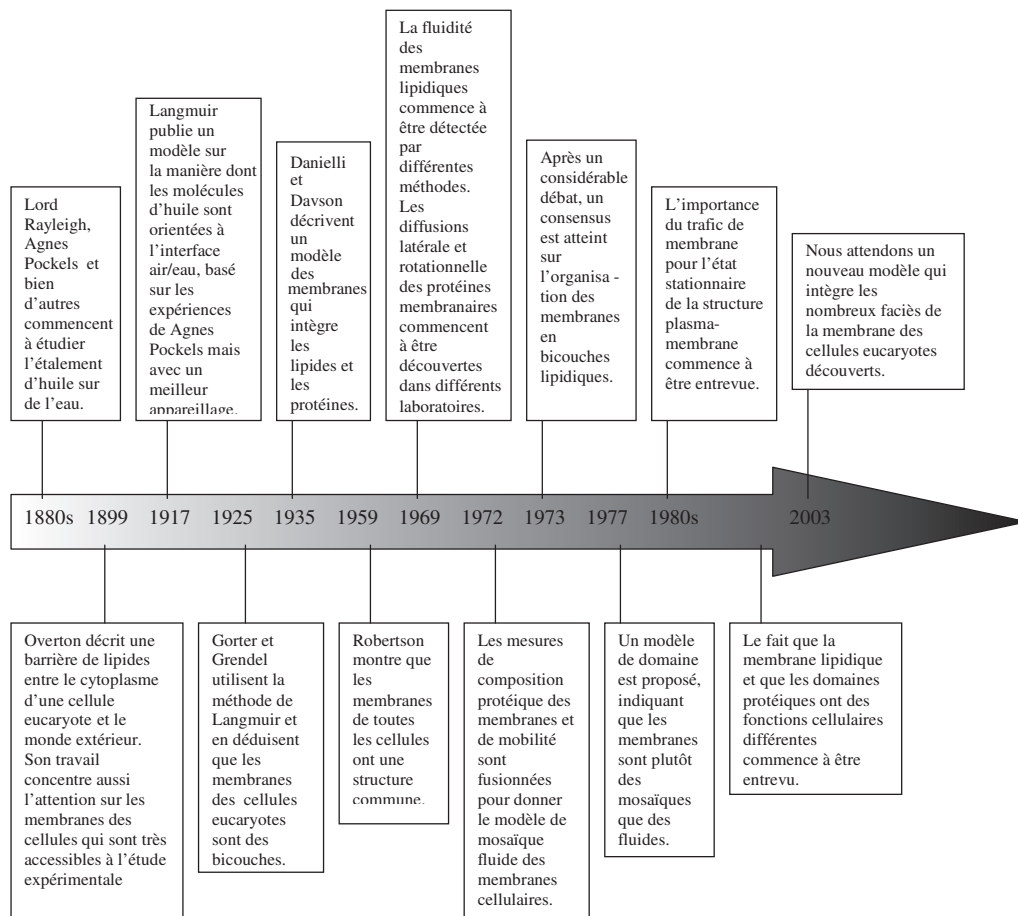


FIG. 2.19 – Chronologie retraçant les principales études et découvertes faites sur les membranes, d'après [Edidin, 2003].

C.1.2 Composition complexe des membranes biologiques

Quelle que soit sa provenance, une membrane est essentiellement composée d'une bicouche lipidique [Singer and Nicolson, 1972] dans laquelle sont insérées des protéines. Un schéma de membrane plasmique est représenté figure 2.20. Suivant le type de membrane, la composition des différents lipides change, ainsi que la quantité de protéines qui peut aller de 25% en masse pour les membranes des cellules nerveuses (myélines) à 75% pour les membranes impliquées dans la transduction de l'énergie (dans les mitochondries ou les chloroplastes), en passant par 50% pour la membrane plasmique. La bicouche lipidique contient principalement des phospholipides (type PE, PS, PC, SM¹⁴(famille des céramides)), du cholestérol et des glycolipides¹⁵. Les principaux lipides sont représentés sur la figure 2.21.

Pour comprendre pourquoi les membranes biologiques ont une composition si

¹⁴voir les abréviations utilisées à la fin du manuscrit

¹⁵lipides contenant des oligosaccharides, jouant un rôle dans l'interaction de la cellule avec l'extérieur

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

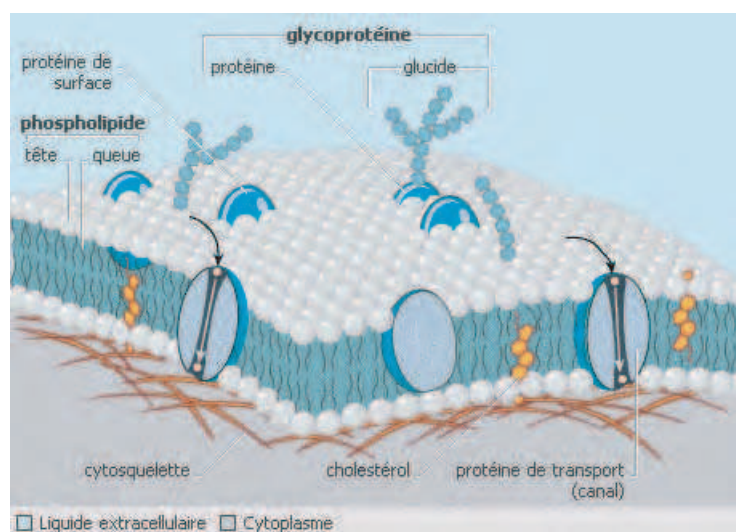


FIG. 2.20 – Schéma représentant une membrane plasmique. On distingue la bicouche lipidique composée de phospholipides, glycolipides et cholestérol, les protéines membranaires et le cytosquelette attaché sur la surface interne de la membrane (site de l'encyclopédie encarta : <http://fr.encarta.msn.com/>).

complexe (il existe entre 500 et 1000 espèces de lipides répertoriés, [Edidin, 2003]), on peut s'imaginer que la membrane sert de solvant à 2 dimensions aux protéines membranaires, comme l'eau est un solvant à 3 dimensions pour les protéines du cytoplasme. Suivant la polarité ou la structure de l'environnement, les conditions d'incorporation et d'activité seront différentes; il est possible aussi qu'il existe un rapport entre la diffusion et l'organisation des lipides autour des protéines et leur action [Gupte et al., 1984]. Un exemple de la diversité de composition des membranes cellulaires est représenté dans le tableau 2.2.

| Lipides | Membrane plasmique des érythrocytes | Myéline | Mitochondrie | Réticulum endoplasmique | E.Coli |
|--------------|-------------------------------------|---------|--------------|-------------------------|--------|
| Cholestérol | 23 | 22 | 3 | 6 | 0 |
| PE | 18 | 15 | 35 | 17 | 70 |
| PS | 7 | 9 | 2 | 5 | traces |
| PC | 17 | 10 | 39 | 40 | 0 |
| SM | 18 | 8 | 0 | 5 | 0 |
| Glycolipides | 3 | 28 | traces | traces | 0 |
| Autres | 13 | 8 | 21 | 27 | 30 |

TAB. 2.2 – Pourcentage en lipides totaux en poids dans plusieurs membranes, d'après [Alberts et al., 1995].

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

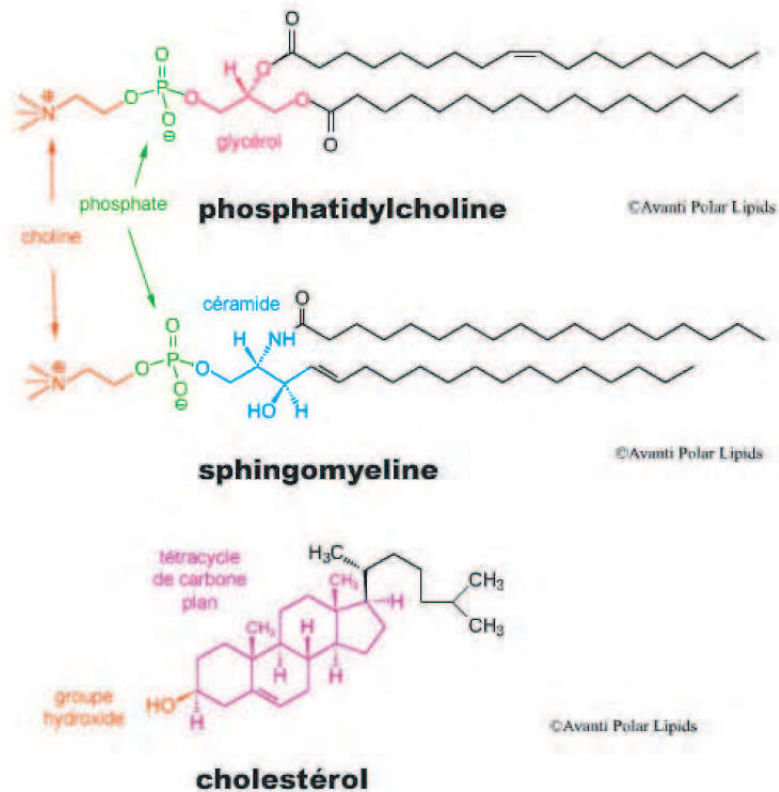


FIG. 2.21 – Structures d’une PC, SM et du cholestérol. Le PC dérive du glycérol alors que la SM dérive d’une céramide. Le cholestérol n’est pas un lipide mais une petite molécule qui s’insère dans la membrane et change ses propriétés physiques (rigidité de courbure, perméabilité etc.)

C.1.3 Organisation non homogène des lipides

Pour finir cette partie sur les membranes biologiques, on peut remarquer que, contrairement aux membranes artificielles étudiées plus loin, elles sont asymétriques, c’est-à-dire que la distribution des lipides dans les deux monocouches de la membrane n’est pas équivalente [Rothman and Lenard, 1977, Devaux and Morris, 2004]. Les glycolipides par exemple se trouvent toujours du côté externe de la membrane. Un autre exemple est celui des hématies humaines dans lesquels les lipides à têtes PC se trouvent essentiellement dans la couche externe alors que la couche interne contient plutôt les lipides à têtes PE et PS. Puisque les PS sont chargés négativement, il peut exister une différence de charges significative entre les deux monocouches. L’asymétrie entre feuillets des membranes biologiques apparaît dès leur synthèse dans le réticulum endoplasmique et est créée grâce à l’action de certains translocateurs, les flippases, qui déplacent les phospholipides d’une monocouche à une autre. Cette asymétrie est potentiellement importante sur le plan fonctionnel, notamment

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

dans la signalisation [Alberts et al., 1995, Sprong et al., 2001].

L'organisation latérale des lipides n'est pas non plus homogène au sein de la membrane. En effet, les SM et le cholestérol ont tendance à se regrouper pour former des microdomaines appelés "rafts"¹⁶. L'hypothèse de l'existence des rafts dans les membranes biologiques a été émise pour expliquer comment les lipides pouvaient être triés et exportés spécifiquement dans le trafic intracellulaire grâce aux propriétés de séparation de phase de ces microdomaines [Simons and VanMeer, 1988, VanMeer, 1993], [Simons and Ikonen, 1997, Helms and Zurzolo, 2004]. Cette hypothèse est en bon accord avec la vision plus générale de la membrane comme "mosaïque fluide" [Singer and Nicolson, 1972]. Plus récemment, ces microdomaines ont pu être observés directement de façon expérimentale [Prior et al., 2003, Philip and Scarlata, 2004].

C.2 Les membranes artificielles : aspects microscopiques

C.2.1 Du lipide au liposome

Pour reconstituer artificiellement les membranes biologiques, ou du moins la contribution passive de la bicouche lipidique, et mimer ainsi leur comportement, il suffit de mettre en solution aqueuse le mélange de lipides souhaité. Les lipides s'autoassemblent alors naturellement pour former différentes sortes de micelles ou de bicouches. En effet, les lipides sont des molécules amphiphiles (fig. 2.22(A)) qui possèdent à la fois une tête polaire hydrophile et une queue hydrophobe (les deux chaînes carbonées). Les queues s'agrègent entre elles pour ne pas être en contact avec l'eau alors que les têtes, au contraire, sont tournées vers l'eau. C'est la forme géométrique du lipide (et donc son nombre d'insaturations qui entraînent des torsions dans la chaîne carbonée, voir figure 2.22(A), qui conditionne le type d'autoassemblage (fig. 2.22(B-C)) et plus particulièrement sa courbure [Israelachvili, 1992] et [Lipowsky and Sackmann, 1995]. L'assemblage de molécules cylindriques donne naissance à une bicouche plane alors que des lipides coniques donnent une bicouche avec une courbure spontanée (voir §C.3.1). Les bicouches peuvent se refermer sur elles-mêmes pour former une **vésicule** (ou liposome, sorte de sphère close où le milieu interne est séparé du milieu externe par la membrane fig. 2.22(B)). Les "vésicules" sont des phases **métastables**¹⁷ [Safran, 1994, Leng et al., 2003], mais elles sont beaucoup utilisées car leur forme sphérique est bien adaptée pour mimer la formes des organites de la cellule. La courbure de la membrane est alors imposée par la géométrie sphérique : pour une sphère de rayon R , la courbure c est donnée par : $c=1/R$. La compatibilité de la courbure de la vésicule avec celle imposée par les lipides utilisés déterminera les conditions de formation et de stabilité d'une vésicule de taille donnée.

¹⁶ou radeaux lipidiques

¹⁷elles sont en général préparées en fournissant de l'énergie, mais cette propriété de métastabilité reste encore très discutée par exemple pour les vésicules obtenues par formation spontanée [Leng et al., 2002]. Les vésicules formées spontanément dans un mélange de surfactants cationiques/anioniques sont considérées comme stables [Kaler et al., 1989].

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

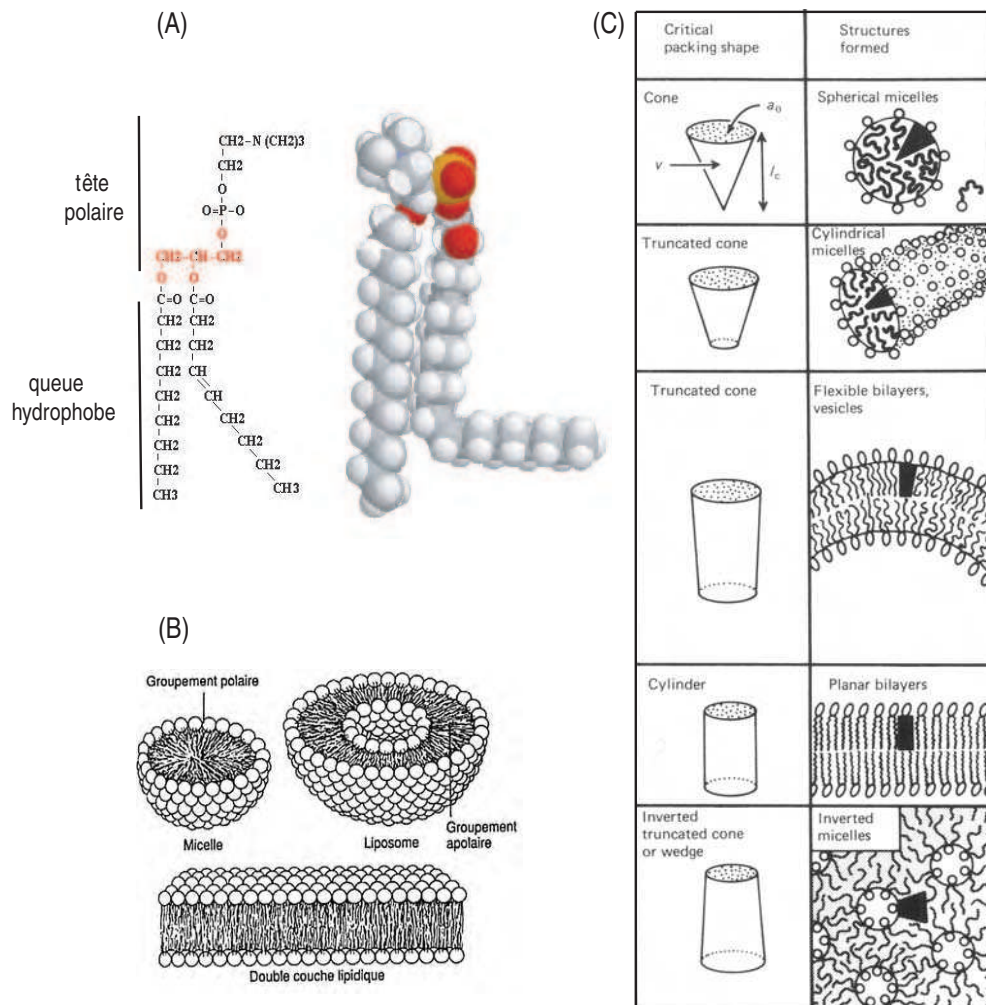


FIG. 2.22 – (A) Modèle compact d'un phospholipide et sa représentation symbolique associée. La molécule amphiphile possède une tête polaire (choline, phosphate et glycerol) hydrophile, et une queue hydrophobe (longue chaîne carbonée). La torsion due à la double liaison "cis" a été volontairement exagérée, d'après [Alberts et al., 1995]. (B) Les lipides cunéiformes s'assemblent pour former des micelles. Les lipides cylindriques forment des bicouches qui peuvent se refermer sur elles-mêmes pour donner des vésicules. (C) Relation entre la forme géométrique des molécules amphiphiles (phospholipides, mais aussi tensio-actifs, lisolipides etc.) et la structure obtenue par l'organisation de ces molécules dans un milieu aqueux. On remarque la diversité des formes d'auto-assemblage : le paramètre important est v/a_0l_c . Les phospholipides ont plus particulièrement tendance à former des bicouches lipidiques planes ou courbes. (D'après [Israelachvili, 1992])

Il existe plusieurs sortes de vésicules : celles constituées d'une seule bicouche (appelées unilamellaires), et celles constituées de plusieurs bicouches (appelées multilamellaires ou oignons). De plus, les vésicules unilamellaires sont classées par taille :

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

- les "Small Unilamellar Vesicles" (SUVs) ayant un diamètre de 40 à 100 nm
- les "Large Unilamellar Vesicles" (LUVs) ayant un diamètre de 100 nm à 1 μm
- les "Giant Unilamellar Vesicles" (GUVs) ayant un diamètre de 1 à 100 μm

Les GUVs sont les seules à pouvoir être observées par microscopie optique, c'est donc celles que nous avons utilisées comme membrane modèle. L'épaisseur typique d'une membrane est en moyenne de 5 nm, (deux fois la longueur d'un lipide) et la surface moyenne occupée par un lipide est de l'ordre de 0,5 nm².

C.2.2 Fluidité des membranes

Outre leurs propriétés d'autoassemblage et d'autofermeture, les bicouches de membranes cellulaires ont aussi une propriété très importante pour les fonctions cellulaires : la **fluidité**. En effet, les lipides (et les protéines dans une membrane biologique) sont capables de diffuser librement à la surface de la membrane. La diffusion latérale liée à l'échange de lipides voisins (fréquence : 10⁷ fois par seconde) est très rapide à l'intérieur d'une monocouche¹⁸ : typiquement, le coefficient de diffusion est de l'ordre du $\mu\text{m}^2/\text{s}$ dans des membranes en phase liquide désordonnée, ce qui signifie qu'il faut environ 1 seconde à un lipide pour parcourir toute la longueur d'une cellule bactérienne (d'une taille de 2 μm). Ce coefficient de diffusion a été mesuré à la fois dans des membranes artificielles et des membranes biologiques par des techniques de plus en plus évoluées (de la RMN [Smith and Oldfield, 1984] au suivi de molécule individuelle de lipide [Saxton and Jacobson, 1997] en passant par des mesures de FRAP¹⁹ ("Fluorescence recovery after photobleaching", [Axelrod et al., 1976]), voir la revue de Chapman [Chapman, 1975]).

Les molécules peuvent aussi tourner sur elles-mêmes avec un coefficient de diffusion rotationnelle de l'ordre de 10⁸ s⁻¹ [Baeriswyl, 1987], et basculer d'une couche à l'autre ("flip-flop"). Ce phénomène est beaucoup plus lent : 10⁻⁸ s⁻¹ [Alberts et al., 1995], mais il peut être accéléré par la présence d'un certain type de protéines, les flippases (voir plus haut), dans la cellule. Ce mouvement de "flip-flop" est donc plus important dans les membranes biologiques [Sprong et al., 2001]. La figure 2.23 résume les différents mouvements d'un lipide dans une membrane.

La fluidité dépend beaucoup de la composition des membranes et de la température [Bretscher, 1973]. En effet, une membrane constituée d'un seul type de lipide peut former des phases plus ou moins ordonnées appelées L_α , L_β ou P_β' [Lipowsky and Sackmann, 1995]. La figure 2.24(A) représente l'exemple du diagramme de phase du DMPC. Typiquement, lorsque la température diminue, la membrane passe d'un état liquide bidimensionnel (L_α) à un état de cristal liquide plus

¹⁸lorsque la température est supérieure à la température de transition de phase état liquide/état cristal liquide (voir un peu plus loin l'influence de la composition lipidique)

¹⁹Cette technique sera étudiée plus en détail au chapitre 4 pour mesurer le coefficient de diffusion des kinésines attachées à la surface des vésicules dans nos expériences.

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

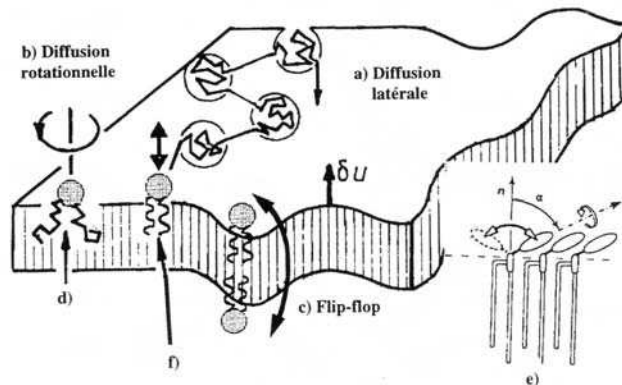


FIG. 2.23 – Principaux degrés de liberté d’un lipide dans une bicouche. (a) diffusion latérale; (b) diffusion rotationnelle; (c) flip-flop; mouvements de chaînes aliphatiques; (e) mouvement des têtes polaires; (f) mouvement de vibration hors du plan de la membrane, d’après [Lipowsky and Sackmann, 1995].

rigide (et plus ordonné) à partir d’une température de transition précise et caractéristique. Cette transition de phase intervient à des températures d’autant plus basses que les lipides sont courts (donc avec moins d’interactions stabilisantes entre eux) et insaturés (donc plus difficile à ordonner dans une phase cristalline). Le coefficient de diffusion des lipides dans des membranes dans l’état de cristal liquide chute de façon dramatique jusqu’à des valeurs de $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, [Shechter, 1993].

Un diagramme de phase riche a aussi été observé dans des vésicules composées de plusieurs lipides et riches en SM ou en cholestérol (voir les structures fig. 2.21). En effet, la SM a une température de transition de phase assez élevée (40 à 50°C) par rapport aux PCs avec insaturations ou courtes chaînes, en phase fluide à température ambiante (voir annexe C.1) ; elle a donc tendance à rendre les membranes moins fluides et même à s’organiser en phases cristallines quand elle est seule. Le cholestérol quant à lui s’insère entre les lipides de la membrane et modifie les interactions entre les têtes des SM, ce qui contribue à la formation d’une phase à la structure probablement hexatique (liquide ordonné). Le cholestérol change aussi les mouvements des chaînes de PC, contribuant à rigidifier les membranes de DOPC. Il diminue aussi largement la perméabilité des bicouches à l’eau. Le diagramme de phase de la figure 2.24(B) issu de [Kahya et al., 2003] montre par exemple l’évolution du coefficient de diffusion de lipides dans des vésicules en fonction de la composition ternaire de celles-ci (SM, DOPC, cholestérol) ; ces coefficients ont été mesurés par FCS ²⁰. On observe

²⁰Fluorescence Correlation Spectroscopy. La FCS utilise un montage de microscopie confocale pour collecter la luminescence de fluorophores se déplaçant dans un volume d’excitation d’une fraction de femtolitre ($1\text{fl} = 1\mu\text{m}^3$). En traversant aléatoirement ce volume, les fluorophores donnent naissance à des fluctuations de l’intensité lumineuse que l’on détecte avec des photo-détecteurs fonctionnant en régime de comptage de photons. L’analyse des fluctuations à l’aide d’un corrélateur permet d’extraire des informations sur la diffusion, la concentration moléculaire et d’éventuelles associations.

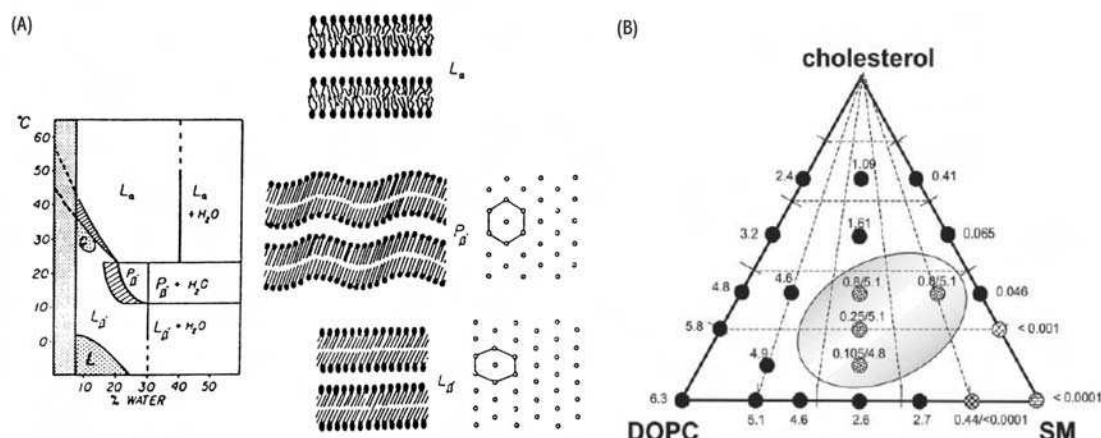


FIG. 2.24 – (A) Diagramme de phase du DMPC dans l’eau (à gauche), avec, représentée schématiquement, l’organisation des lipides dans chaque type de phase (à droite) (d’après [Seifert, 1997]). (B) Diagramme de phase ternaire SM/DOPC/cholestérol à 25 °C, construit sur la base d’images de microscopie confocale et de données FCS. La région en gris représente les compositions où une séparation de phases est observée. Les cercles noirs représentent les vésicules homogènes, les cercles avec des briques des phases gel pure et les autres cercles représentent la coexistence entre phases plus complexes. Le nombre entre parenthèses donne le coefficient de diffusion en $\mu m^2/s$ (d’après [Kahya et al., 2003]).

que ce coefficient de diffusion diminue beaucoup pour des vésicules riches en SM ou cholestérol par rapport au coefficient des vésicules de PCs purs. Nous utiliserons dans la suite les propriétés de ces vésicules plus rigides (voir ch.4 et 5). Les vésicules contenant de la SM et du cholestérol sont très étudiées actuellement parce qu’elles permettent de mimer la présence de "rafts" (présentés dans le paragraphe C.1.3) dans les membranes biologiques (fig. 2.25) [Baumgart et al., 2003, Roux et al., 2005a].

C.3 Caractéristiques macroscopiques des vésicules à l’équilibre

Nous allons maintenant nous intéresser aux caractéristiques macroscopiques des membranes de vésicules, c’est-à-dire à des échelles beaucoup plus grandes que la taille d’un lipide. La membrane est alors vue comme un milieu continu. Nous allons notamment introduire les paramètres de tension de membrane et rigidité de courbure qui jouent un rôle très important dans la formation de tubes de membrane à partir de vésicules. Bien entendu, ces paramètres macroscopiques sont fortement liés à la structure microscopique de la membrane décrite au paragraphe précédent.

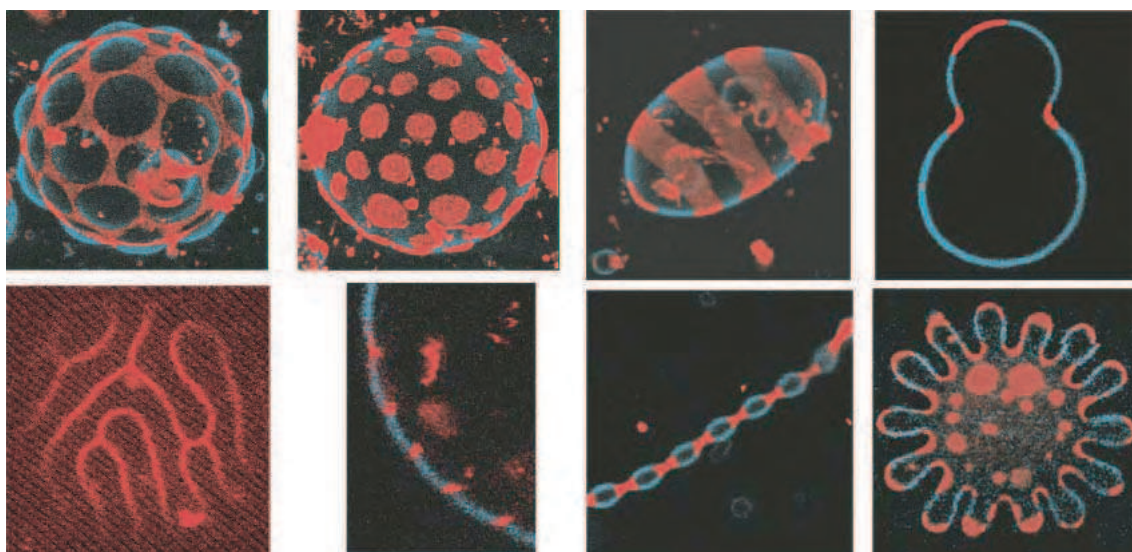


FIG. 2.25 – Séparation de phase observée en microscopie à deux photons sur des GUVs composées de SM, de DOPC et de cholestérol comme dans la figure 2.24(B). On observe la coexistence entre phases liquide ordonnée (Lo, riche en SM et cholestérol) et liquide désordonnée (Ld, riche en DOPC). La proportion de chaque lipide est variable. La phase Lo est marquée en bleu et la phase Ld en rouge, les images correspondent à une superposition des deux couleurs. La température varie entre 25°C et 50°C, d’après [Baumgart et al., 2003].

C.3.1 Modélisation physique de la membrane

Les premiers travaux théoriques pour comprendre la forme des vésicules datent des années 1970 avec les travaux de Canham [Canham, 1970], Helfrich [Helfrich, 1973], et Evans [Evans, 1973]. Ils ont montré notamment l’importance du rôle de l’élasticité de courbure des membranes. Les trois types de déformation d’une membrane sont représentés figure 2.26 : extension/compression, cisaillement et courbure de la membrane. Toute déformation est en fait une combinaison linéaire de ces trois déformations élémentaires qui font partie de classes de symétries différentes : déformation isotrope pour l’étirement, déformation à surface constante pour le cisaillement de déformation perpendiculaire au plan de la membrane pour la courbure. A chacune de ces déformations est associée une énergie (voir les revues [Eggl and Sackmann, 1989, Sackmann, 1989]).

* Extension/compression

La densité (surfactive) d’énergie associée à l’extension/compression est donnée par l’équation suivante :

$$H_{ext} = \frac{1}{2}\chi \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (2.6)$$

où χ est le module de compressibilité (en J/m²) et $\frac{\Delta A}{A}$ la variation relative de surface

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

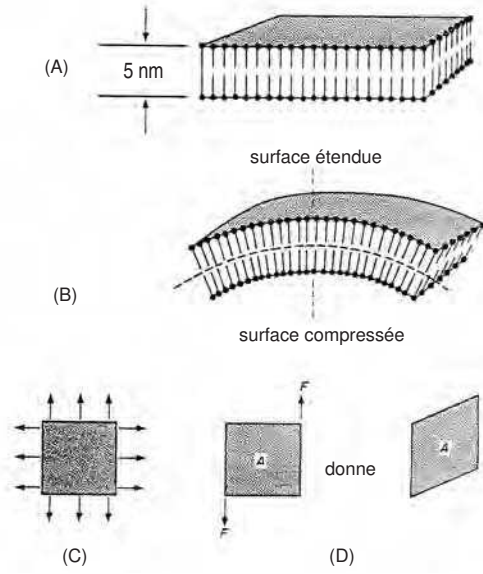


FIG. 2.26 – Différents modes de déformation d'une membrane pris en compte dans le hamiltonien de Canham-Helfrich. (A) Une vue schématique de la membrane d'une vésicule; (B) Courbure de la membrane; (C) Extension/compression de la membrane; (D) Cisaillement, d'après [Canham, 1970].

associée à la déformation qui n'excède jamais 8%. En effet, au-delà de cette variation d'aires, des pores s'ouvrent dans la membrane pour une tension critique de lyse de l'ordre de 10^{-3} N/m et la vésicule est complètement détruite [Sandre et al., 1999]. χ est de l'ordre de $0,2$ J/m² [Evans and Rawicz, 1990, Olbrich et al., 2000].

* Cisaillement

La densité d'énergie associée au cisaillement est obtenue à partir de la loi de Hooke et est donnée par l'équation suivante :

$$H_{cis} = \frac{1}{2}\mu (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad (2.7)$$

où $\lambda = (L_0 + \Delta L)/L_0$ est le taux d'extension latérale et μ le module de cisaillement (en J/m²). Ce terme n'a d'importance que pour les membranes en phase cristal liquide ou pour des membranes polymérisées. Lorsque la membrane est liée au réseau de cytosquelette, alors la friction entre les deux composants devient non négligeable. On peut dans ce cas mesurer un module de cisaillement. Le globule rouge a par exemple $\mu=6.10^{-6}$ J/m² [Mohandas and Evans, 1994]. Pour les vésicules en phase fluide que nous avons utilisées, ce terme est négligeable puisque les lipides n'offrent aucune résistance au cisaillement.

* Courbure

La densité d'énergie de courbure, qui s'avérera être la contribution principale des trois déformations citées, est donnée par l'équation suivante :

$$H_{courb} = \frac{1}{2}\kappa(c_1 + c_2 - c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2 \quad (2.8)$$

où $c_1 = 1/R_1$ et $c_2 = 1/R_2$ sont les courbures principales de la membrane (fig. 2.27), c_0 la courbure spontanée et le produit $c_1 \cdot c_2$ la courbure gaussienne. κ est le module

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

de rigidité de courbure (homogène à une énergie) et κ_G est le module de courbure gaussienne (homogène à une énergie).

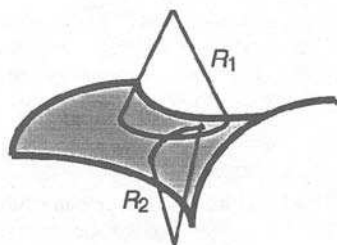


FIG. 2.27 – Rayons de courbure principaux R_1 et R_2 . Dans cet exemple, la courbure $1/R_1$ est négative alors que la deuxième $1/R_2$ est positive et opposée. La courbure moyenne est alors nulle et la courbure gaussienne est négative.

Le théorème de Gauss-Bonnet montre que la courbure gaussienne intégrée sur la surface de la vésicule fermée est un invariant topologique, c'est-à-dire que si on déforme la membrane sans faire de trous, la contribution due à la courbure gaussienne ne change pas. Nous ne prendrons donc pas en compte ce terme dans notre cas puisque les vésicules ne changent pas de topologie (ce qui serait le cas s'il y avait formation de tores ou de boutons. Ces formes "avec trous" ont été à la fois prévus théoriquement [Seifert, 1991, Jülicher, 1996] et observés expérimentalement [Mutz and Bensimon, 1991, Michalet et al., 1994]). La courbure spontanée c_0 correspond à une éventuelle asymétrie dans la composition des deux feuilletts de la membrane ou bien à la forme adoptée par la bicouche en l'absence de contrainte (voir fig. 2.22(C)). Le module de rigidité de courbure κ est de l'ordre de quelques dizaines de $K_B T$ (quelques 10^{-20} à 10^{-19} J), et dépend de la composition de la membrane et de la température [Evans and Rawicz, 1990, Rawicz et al., 2000]. Il contient en effet tout le détail microscopique de la bicouche²¹ (longueur des queues lipidiques, présence d'insaturations, nature des interactions entre têtes polaires etc.). Il existe deux principaux types de techniques pour mesurer la rigidité de courbure d'une vésicule :

- les techniques basées sur l'analyse des fluctuations de formes de vésicules qui combinent une détection de contour et une analyse de Fourier rapides des images obtenues en microscopie de fluorescence [Schneider et al., 1984], en contraste de phase [Faucon et al., 1989, Pécereaux et al., 2004] ou en lumière pulsée [Méléard et al., 1992].
- les techniques qui analysent la réponse élastique d'une vésicule à une déformation mécanique qui peut être provoquée soit par aspiration dans une micropipette [Kwok and Evans, 1981, Zhelev et al., 1994], soit par formation d'un tube de membrane à tension contrôlée²² [Bo and Waugh, 1989], soit par l'action d'un champ électrique [Kummrow and Helfrich, 1991], soit par l'action d'un champ magnétique sur une vésicule remplie de ferrofluides [Bacri et al., 1996].

D'après Canham et Helfrich, [Canham, 1970, Helfrich, 1973] (Canham avait d'abord prévu un terme de courbure en $c_1^2 + c_2^2$), le terme de courbure constitue

²¹ce que l'on comprend avec les remarques faites dans le §C.2.2 sur la fluidité des membranes.

²²grâce à l'utilisation d'une micropipette

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

la contribution principale aux propriétés mécaniques de la membrane. Intégré sur toute la surface, il donne le **hamiltonien de Canham-Helfrich** :

$$H = \oint \left(\frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \kappa_G c_1 c_2 \right) dA \quad (2.9)$$

Ce hamiltonien suffit en première approximation à décrire la forme d'une membrane. Il constitue le modèle dit "**modèle de courbure**".

Le tableau 2.3 donne un ordre des grandeurs des trois modules élastiques pour différents matériaux :

| Matériau | Module de compressibilité χ (en J/m ²) | Module de cisaillement μ (en J/m ²) | Module de courbure κ (en J) |
|--------------------|--|--|---------------------------------------|
| Acier | 100 | 100 | 10^{-15} |
| Polyéthylène | 5 | 5 | $5 \cdot 10^{-17}$ |
| Globule Rouge | 10^{-5} | $6 \cdot 10^{-6}$ | $2-70 \cdot 10^{-20}$ |
| Bicouche lipidique | $100-700 \cdot 10^{-3}$ | 0 | $4-40 \cdot 10^{-20}$ |

TAB. 2.3 – Ordre des grandeurs des trois modules élastiques χ , μ et κ pour différents matériaux, d'après [Sackmann, 1994]

Remarque : il est aussi possible de tenir compte de la dilatation thermique d'une membrane à volume constant, en plus des autres modes de déformation :

$$\beta = \frac{1}{A_0} \frac{dA}{dT} \quad (2.10)$$

où A_0 est l'aire initiale de la vésicule. Sa contribution peut être non négligeable ; par exemple, dans le cas de vésicules contenant du SOPC, $\beta = (2,7 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ [Kwok and Evans, 1981].

* Tension de membrane

Le dernier paramètre macroscopique important pour décrire les propriétés d'une membrane est la tension latérale σ , qui est le paramètre intensif associé à l'aire de la vésicule $\sigma = \partial F / \partial A$ (où F est l'énergie libre de la membrane).

✓ Régime enthalpique

Lorsque l'on tire sur une membrane, celle-ci est mise sous tension et son aire varie de ΔA . La variation d'énergie associée à cette transformation est bien $\Delta F = \sigma \Delta A$. On peut donc introduire une densité d'énergie surfacique liée à la variation de surface pour une membrane tendue :

$$H_{tens} = \sigma \frac{\Delta A}{A} \quad (2.11)$$

Avec les notations précédentes, on a donc :

$$\sigma_H = \partial(H.A)/\partial(\Delta A) = \chi \frac{\Delta A}{A} \quad (2.12)$$

L'origine de la tension est ici **enthalpique** (d'où l'indice H), mais ne décrit pas tous les régimes de tensions possibles. En effet, la relation 2.12 n'est vraie que lorsque l'aire A est l'aire réelle de la membrane donc lorsque la **vésicule** est déjà **tendue**²³.

✓ *Régime entropique*

La plupart du temps, les vésicules sont dans un régime non tendu, donc fluctuant (voir fig. 2.28(a)), où l'aire observée avec nos outils de microscopie ne correspond pas à l'aire réelle de la surface mais à l'aire projetée (voir fig. 2.28(c)). Seules les déformations de plus grandes longueurs d'onde sont visibles optiquement (fig. 2.28(a)), lorsque la tension de membrane est faible. On a vu que les vésicules étaient des objets très déformables ; elles sont donc perpétuellement déformées par les chocs des molécules d'eau²⁴ à leur surface lorsqu'elles sont plongées dans un milieu aqueux. Ces chocs créent des ondulations de la surface qui est donc animée de petits mouvements autour de sa position d'équilibre. Ces fluctuations avaient été observées il y a plus d'un siècle par E. Browicz sous forme de fluctuations de la lumière diffusée par des globules rouges. Ce scintillement a fini par être expliqué en termes de fluctuations de membrane en 1975 grâce à l'article de F. Brochard et J.-F. Lennon, de façon complètement indépendante des processus actifs internes aux cellules [Brochard and Lennon, 1975].

Lorsque l'on tire sur une vésicule fluctuante, on commence donc par déplier les fluctuations de la membrane, sans changer l'aire projetée. Suivant l'article de Helfrich et Servuss, [Helfrich and Servuss, 1984], et grâce à des arguments géométriques, on peut toujours écrire la densité d'énergie associée à la tension comme dans l'équation 2.11, en utilisant comme excès d'aire : $\frac{\Delta A}{A} = \frac{A - A_p}{A}$ la variation relative entre l'aire réelle et l'aire projetée. La densité d'énergie surfacique d'une **vésicule fluide et fluctuante** est alors donnée par la somme du terme de courbure (sans la contribution due à la courbure gaussienne constante dans ce cas) et du terme de tension puisque les termes de cisaillement et d'extension sont négligeables. En l'absence d'échange de lipides entre la membrane et le fluide environnant, la membrane peut être considérée comme incompressible, et autrement dit avec une aire constante indépendante de sa forme. Cette contrainte doit être incorporée dans le hamiltonien qui décrit l'énergie de la membrane par l'intermédiaire d'un multiplicateur de Lagrange associé à l'aire d'un petit élément de surface dA. Ce multiplicateur correspond à la tension locale de la membrane. Comme la membrane est fluide, la tension est homogène sur toute la

²³c'est-à-dire lorsque que toutes les fluctuations de la membrane sont déjà dépliées, voir plus loin

²⁴animées d'un mouvement brownien

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

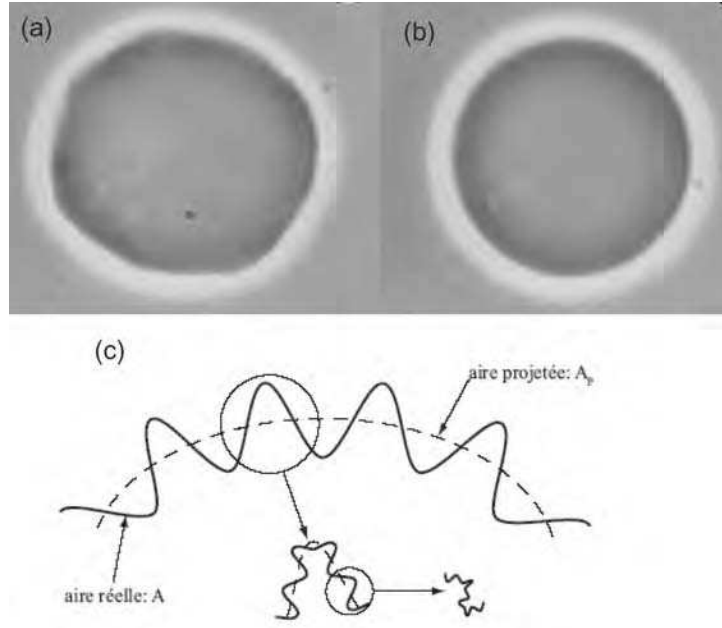


FIG. 2.28 – Ondulations thermiques d’une vésicule géante observée en contraste de phase : (a) vésicule soumise à des fluctuations thermiques de grande amplitude qui froissent la membrane (la tension de la membrane est alors très faible; (b) vésicule tendue, sa forme est alors sphérique. La barre représente $10 \mu m$; (c) représentation schématique d’une membrane fluctuante à toutes les échelles spatiales. L’aire réelle A est en ligne continue et l’aire projetée A_p en traits pointillés (d’après [Girard et al., 2005]).

surface, le multiplicateur peut donc être assimilé à la tension globale de la membrane σ . La densité d’énergie surfacique totale de la membrane a donc pour expression :

$$H = \frac{1}{2}\kappa(c_1 + c_2 - c_0)^2 + \sigma \frac{\Delta A}{A} \quad (2.13)$$

En appliquant le théorème d’équipartition de l’énergie, pour chaque mode de fluctuation, avec la densité d’énergie donnée par l’équation précédente 2.13, on obtient la tension de membrane d’une vésicule fluide et fluctuante qui a alors une origine **entropique** (d’où l’indice s) :

$$\sigma_s \simeq \frac{\kappa}{l^2} \exp\left(-\frac{8\pi\kappa}{K_B T} \frac{A - A_p}{A}\right) \quad (2.14)$$

où l est un ”cutt-off” microscopique [Helfrich, 1985]. On observe bien que plus la différence entre l’aire réelle et l’aire projetée est grande, plus la tension est faible et la membrane est fluctuante.

✓ Cas général

Dans le cas général, il faut tenir compte des deux contributions à la tension de membrane, enthalpique et entropique. La variation de l’excès de surface $\frac{\Delta A}{A}$ entre

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

un état initial de tension nulle et un état final de tension σ , $\Delta\alpha = \alpha^0 - \alpha$, est alors donnée par la contribution due au défroissage des fluctuations et la contribution due à l'extension de la membrane (voir les calculs dans [Evans and Rawicz, 1990]) :

$$\Delta\alpha = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \ln(1 + cA\sigma) + \frac{\sigma}{\chi} \quad (2.15)$$

où $c=1/24\pi$ et A est l'aire de la vésicule, dans l'approximation "aire constante" et "volume constant". C'est cette formule qui est généralement utilisée dans les expériences de micromanipulation de vésicules²⁵, pour mesurer leur module de rigidité de courbure [Evans and Rawicz, 1990, Zhelev et al., 1994] (fig. 2.29). Dans le régime de faible tension ($\sigma < 10^{-5}$ N/m), seul le premier terme contribue. Dans les gammes accessibles de tension (10^{-8} à 10^{-3} N/m) et de rigidité de courbure (10^{-20} à 10^{-19} J), en utilisant les valeurs extraites du tableau 2.3, on peut calculer que l'excès de surface relatif ne peut jamais dépasser 8 %, ce qui correspond à la valeur énoncée plus haut.

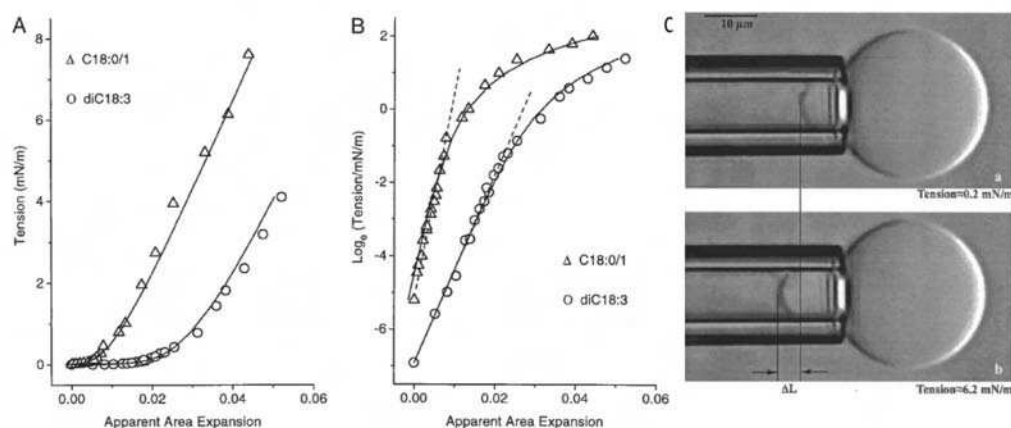


FIG. 2.29 – Exemples d'excès de surface d'une vésicule aspirée dans une micropipette en fonction de la tension de membrane pour deux compositions différentes de vésicule (C18 :0/1 et diC18 :3, voir annexe A). (A) Représentation linéaire. L'ajustement des données utilise l'équation 2.15 et permet de remonter aux caractéristiques de la membrane (rigidité de courbure κ et module de compressibilité χ). (B) Représentation semi-logarithmique. La première partie de la courbe, à faible tension, correspond au régime entropique : la dépendance $\ln\sigma/\Delta\alpha$ est linéaire, la pente donnant accès à κ . La deuxième partie de la courbe, après le coude, correspond au régime enthalpique. (C) Images d'une vésicule aspirée dans une micropipette à faible tension (en haut) et haute tension (en bas). La variation de la taille de la langue dans la pipette ΔL permet de remonter à la variation d'excès de surface de la vésicule entre les deux images, d'après [Rawicz et al., 2000].

²⁵c'est-à-dire lorsque une vésicule est aspirée de façon contrôlée dans une micropipette en vue de contrôler sa tension de membrane, (technique mise au point par Evan Evans [Kwok and Evans, 1981])

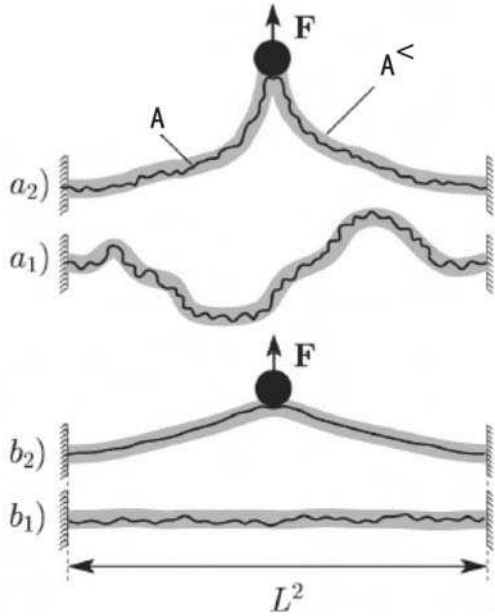


FIG. 2.30 – Représentation schématique d’une membrane avec une aire microscopique A et une aire optique $A^<$, attachée sur un cadre de surface L^2 . La tension effective d’une membrane initialement plane (b_1) peut être accrue par une force externe (b_2). Dans le cas d’une membrane initialement sans tension (a_1), une force externe peut induire une tension (a_2). Adaptée de [Fournier et al., 2001].

Plus récemment, J.-B. Fournier et al. [Fournier et al., 2001] ont réussi à donner une définition de la tension valable à la fois dans le régime entropique et dans le régime enthalpique sans ajouter de façon ad-hoc la partie enthalpique. Ils ont pour cela fait la différence entre l’aire microscopique (qu’on appelait avant l’aire réelle A), l’aire projetée appelée ici L^2 et l’aire ”optique”, qui correspond à l’aire visible au microscope appelée ici²⁶ $A^<$, mais qui est différente de la simple projection L^2 (voir fig. 2.30). Le ”coarse-graining” est lié à la résolution limitée d’un microscope optique. La tension est alors la variable intensive associée non plus à l’aire réelle, A , mais à l’aire observée, $A^<$. Dans le cas d’un régime peu tendu, la tension a pour expression :

$$\sigma = \frac{\kappa}{l^2} \exp\left(-\frac{8\pi\kappa}{K_B T} \frac{A - A^<}{L^2}\right) \quad (2.16)$$

à comparer avec l’équation 2.14. Dans le cas général, la relation tension-excès de surface a la même forme que l’équation 2.15.

C.3.2 Formes d’équilibre des vésicules

La forme des vésicules est obtenue par minimisation de leur énergie. Même si la forme sphérique correspond le plus souvent à la forme d’équilibre, toute une variété de formes peut être obtenue en faisant varier les paramètres caractéristiques de la vésicule : le volume, la surface, la courbure spontanée ou la température [Lipowsky and Sackmann, 1995]. Les diagrammes de phase obtenus dépendent de la complexité du modèle utilisé.

²⁶pour rester cohérent dans l’expression de l’aire réelle et microscopique A . En effet, A correspond à l’aire ”optique” dans l’article de J.-B. Fournier.

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

* Le **modèle** le plus simple consiste juste à minimiser l'énergie de **courbure** des vésicules (donnée par le hamiltonien de Canham-Helfrich eq. 2.9) :

✓ Sans courbure spontanée ($c_0 = 0$), les formes d'équilibre ne dépendent que du volume adimensionné $v = V/(\frac{4}{3}\pi R^3)$, où R représente le rayon de la vésicule. On obtient alors des ellipsoïdes et haltères prolates, ellipsoïdes et discocytes oblates ou stomatocytes puis sphères en augmentant v . On peut remarquer comme la forme discocyte oblate rappelle la forme d'un globule rouge.

✓ Avec courbure spontanée ($c_0 \neq 0$), le diagramme de phase dépend du volume adimensionné et de la courbure adimensionnée $c_0 \cdot R$. Le cas $c_0 > 0$ favorise une forme nouvelle de poire ("pear"), $c_0 < 0$ favorise les formes oblates.

Cependant, le modèle simple de courbure ne suffit pas à prédire toutes les formes de vésicules observées expérimentalement, y compris par exemple, la forme d'étoile de mer ("starfish") [Wintz et al., 1996] (fig. 2.31(D)). Une des raisons venait du fait que le modèle ne tenait pas compte de l'asymétrie d'aire entre les deux feuillets de la membrane.

* Le **modèle ADE** ("Area Difference Elasticity") a été mis au point pour tenir compte de la de l'asymétrie de la bicouche lipidique. En effet, si la membrane est courbée (voir fig. 2.26(B)), le feuillet interne est plus comprimé que le feuillet externe; ils n'ont donc pas la même surface totale. Cette asymétrie apparaît aussi si les deux feuillets ne contiennent pas le même nombre de lipides. Ceci engendre une courbure supplémentaire de la membrane et donc une différence de surface totale plus grande entre les feuillets. Le modèle ADE tient compte de cette asymétrie via un module d'élasticité non local appelé $\bar{\kappa}$ [Svetina and Zeks, 1989, Miao et al., 1994]. Il faut ajouter au hamiltonien de Canham-Helfrich (eq. 2.9, sans courbure spontanée ni courbure gaussienne) une énergie qui représente l'étirement des deux couches l'une par rapport à l'autre; ce terme est non local²⁷, contrairement aux différentes contributions citées plus haut (extension, courbure, etc.). L'énergie intégrée sur toute la surface de la vésicule a maintenant comme expression :

$$H = \oint \frac{1}{2} \kappa (c_1 + c_2)^2 dA + \frac{\pi \bar{\kappa}}{2Ad^2} (M - M_0)^2 \quad (2.17)$$

où d représente l'épaisseur de la bicouche, M la différence d'aire entre les deux feuillets ($M = d \oint (c_1 + c_2) dA$) et M_0 la différence d'aire due strictement à la différence de nombre de lipides entre feuillets. M_0 (grandeur intégrée sur toute la vésicule) reflète l'asymétrie entre feuillets et illustre la tendance de la membrane à se courber, sans pour autant pouvoir être assimilée à une courbure spontanée (grandeur locale). Un bon ordre de grandeur pour la courbure non locale est donné par : $\bar{\kappa} = 4\kappa/\pi$, soit une dizaine de $K_B T$ [Waugh et al., 1992, Heinrich et al., 1999].

Le diagramme de phase obtenu avec le modèle ADE dépend alors de trois paramètres :

- le volume adimensionné $v = \frac{V}{(4/3)\pi(A/4\pi)^{3/2}}$, qui mesure l'état de gonflement de la vésicule. Le dénominateur représente le volume qu'aurait la vésicule si elle

²⁷c'est-à-dire résulte d'une intégration sur toute la surface de la vésicule

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

était sphérique.

- le rapport entre les deux modules élastiques $q = \bar{\kappa}/\kappa$ [Döbereiner et al., 1997].
- la différence d'aire adimensionnée entre les deux feuillettes : $\Delta a_0 = \frac{M_0}{8\pi d(A/4\pi)^{3/2}}$

Il est représenté en partie dans la figure 2.31 : seuls deux paramètres varient, v et $\overline{\Delta a_0}$ qui correspond à l'aire adimensionnée effective entre les deux feuillettes. $\overline{\Delta a_0}$ est la somme de deux sources de courbure, celle venant de l'asymétrie entre les feuillettes mentionnée précédemment Δa_0 et celle venant de la courbure spontanée c_0 rajoutée au modèle ADE : $\overline{\Delta a_0} = \Delta a_0 + \frac{1}{2\pi q}c_0$.

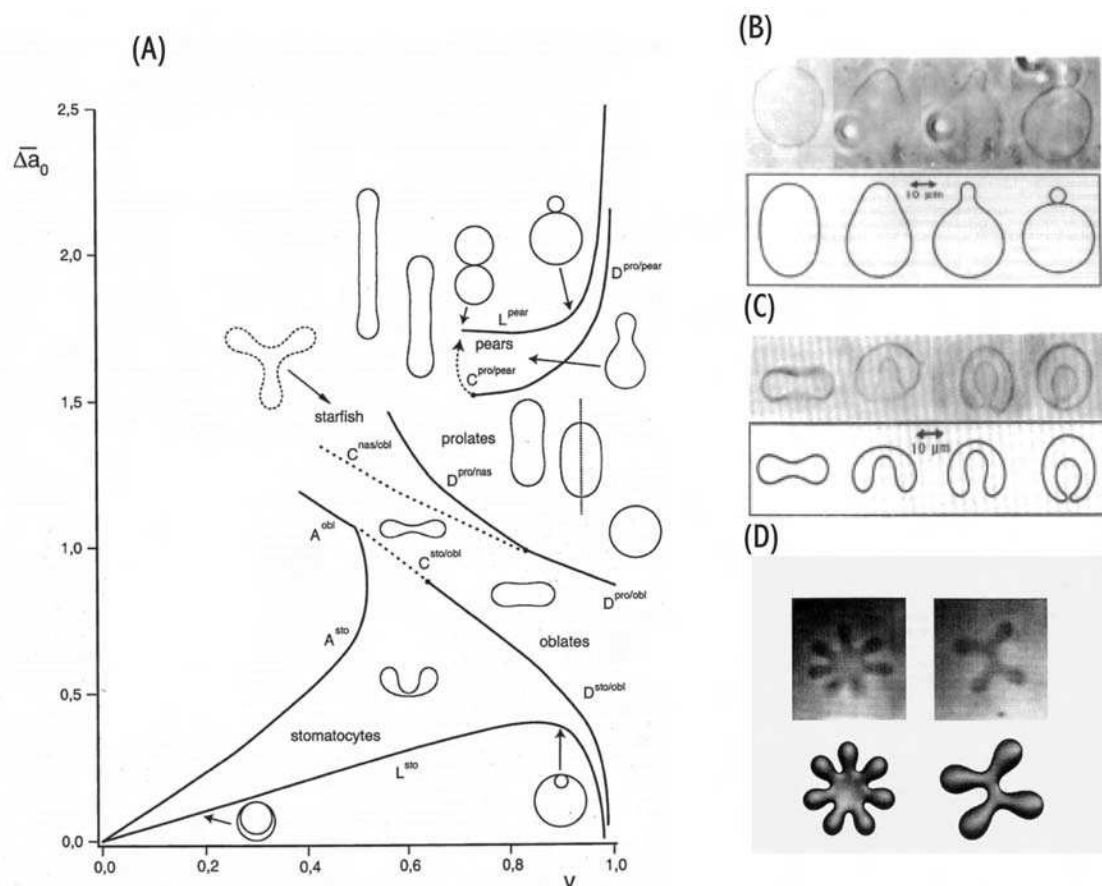


FIG. 2.31 – (A) Diagramme de phase des vésicules dans le modèle ADE des formes accessibles aux vésicules dans l'espace des paramètres : volume réduit v et différence d'aire effective entre les deux feuillettes $\overline{\Delta a_0}$, d'après [Döbereiner, 2000]. (B) Transition prolate-poire par élévation de température donnant lieu à un bourgeonnement. (C) Transition discocyte-stomatocyte par élévation de température ((B-C) d'après [Lipowsky and Sackmann, 1995]). (D) Vésicule en forme d'étoile de mer (d'après [Wintz et al., 1996]).

Notons que certaines transitions ont été étudiées plus en détail, comme la transition prolate-oblate [Heinrich et al., 1993, Jaric et al., 1995, Döbereiner et al., 1997] ou la transition prolate-poire [Döbereiner et al., 1995]. Cette dernière explique théo-

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

riquement les expériences de J.Käs et E.Sackmann qui avaient observé le phénomène de bourgeonnement d'une vésicule "fille" à partir d'une vésicule "mère" initiale [Käs and Sackmann, 1991] en augmentant la **température** progressivement²⁸ (fig. 2.31(B)). Il est aussi possible de faire varier d'autres paramètres pour observer un changement de forme des vésicules : citons par exemple la **différence d'osmolarité** entre les milieux intérieur et extérieur de la vésicule qui permet de faire varier le rapport surface sur volume (le phénomène de vésiculation a aussi été observé dans ce cas, ainsi que la fission [Dobereiner et al., 1993]) ou l'ajout de phospholipides dans un seul des feuillet de la membrane [Farge and Devaux, 1992].

Les formes moyennes obtenues théoriquement sont toutes axisymétriques, mais il est possible d'obtenir numériquement des formes non-axisymétriques avec le modèle ADE ou bien le module de courbure avec un terme de courbure spontanée non nulle [Heinrich et al., 1993, Jie et al., 1998]. Si les vésicules sont suffisamment dégonflées, le modèle ADE permet de prévoir les étoiles de mer (fig. 2.31(D)). Un exposé détaillé de tous les modèles permettant de décrire les formes d'équilibre des vésicules (en plus des modèles de courbure et ADE cités ici) peut être trouvé dans [Seifert, 1997] et est résumé dans le tableau 2.4.

| Modèle | Energie | Variable fixée |
|---------|--|----------------|
| minimal | $\kappa \oint dA (c_1 + c_2)^2$ | A, V |
| BC | $\kappa \oint dA (c_1 + c_2)^2$ | A, V, M |
| ADE | $\kappa \oint dA (c_1 + c_2)^2 + \bar{\kappa} \frac{\pi}{2Ad^2} (M - M_0)^2$ | A, V |
| SC | $\kappa \oint dA (c_1 + c_2 - c_0)^2$ | A, V |
| ADE-SC | $\kappa \oint dA (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa} \frac{\pi}{2Ad^2} (M - M_0)^2$ | A, V |

TAB. 2.4 – Principaux modèles pour rendre compte de l'élasticité de courbure d'une membrane ; Modèle minimal, "Bilayer Coupling" (BC), "Area Difference Elasticity" (ADE), "Spontaneous Courvature" (SC). A désigne l'aire de la vésicule, V son volume, d l'épaisseur de la bicouche, M la différence d'aire entre les deux feuillet et M_0 la différence d'aire due strictement à la différence de nombre de lipides entre feuillet (d'après [Seifert, 1997]).

Notons enfin que même si certaines des formes d'équilibre des vésicules inventoriées ici ont une ressemblance avec des organites ou des cellules observés dans le monde vivant, elles ne peuvent illustrer toutes les observations expérimentales (comme l'échinocytose des globules rouges [Lipowsky and Sackmann, 1995]). Pour mieux comprendre et modéliser les membranes biologiques, il paraît essentiel de tenir compte non seulement du couplage avec le cytosquelette, mais aussi des éventuelles sources de bruit hors équilibre [Prost and Bruinsma, 1996, Ramaswamy et al., 2000,

²⁸Ce bourgeonnement contrôlé peut être rapproché des phénomènes d'exocytose observés dans les cellules.

Chapitre 2. Principales caractéristiques des constituants impliqués dans la formation de tubes de membrane.

Ramaswamy and Rao, 2001].

C.3.3 Application d'une contrainte

L'action d'une contrainte extérieure sur une vésicule peut provoquer un changement de sa forme ; la vésicule est d'abord déstabilisée puis relaxe vers sa position d'équilibre si la contrainte est arrêtée. De nouvelles formes sont alors possibles en plus de celles décrites au paragraphe précédent, puisqu'elles résultent de l'application d'une force extérieure.

Il existe plusieurs possibilités pour appliquer une contrainte extérieure sur une membrane :

- appliquer un flux hydrodynamique (théorie : [Kraus et al., 1996, Seifert, 1999] ; expérience : [Peterson, 1992, Abkarian et al., 2002] par exemple) ; un cisaillement fort peut conduire jusqu'à la formation de tubules et de longs filaments [Shahidzadeh et al., 1998, Rossier et al., 2003].
- appliquer une pince optique [Bar-Ziv and Moses, 1994] qui peut provoquer l'expulsion de lipides de la vésicule "mère" et provoquer un phénomène de vésiculation²⁹ [Moroz et al., 1997] ou bien provoquer une augmentation rapide de la tension de membrane [Bar-Ziv and Moses, 1994].
- appliquer un étirement mécanique avec une micropipette par exemple, qui peut conduire jusqu'à l'extraction d'un **tube de membrane** [Bo and Waugh, 1989, Evans et al., 1996, Heinrich et al., 1999, Xu and Döbereiner, 2000] ou bien avec un champ électrique [Kummrow and Helfrich, 1991].
- utiliser des moteurs moléculaires qui sont capables de déformer la membrane et tirer des tubes [Roux et al., 2002, Koster et al., 2003]

En ajoutant un terme qui contient la contrainte de force axiale appliquée à la vésicule (par exemple grâce à une micropipette ou une pince optique) dans le hamiltonien qui la décrit, il est possible de déterminer un nouveau diagramme de phase de la vésicule étirée [Heinrich et al., 1999]. Le diagramme a alors 4 dimensions, une de plus que dans le modèle ADE (voir §C.3.2), la quatrième dimension représentant la variation de la force appliquée. La figure 2.32(A-C) donne quelques formes possibles des vésicules étirées : chaque ligne correspond à une série de formes pour Δa_0 , v et q ³⁰ et une force croissante qui s'applique sur la vésicule. On observe alors l'évolution de la forme "citron" pour une faible force appliquée à une forme plus arrondie connecté à un tube de membrane pour une force plus importante. Une brisure de symétrie s'opère de façon continue ou discontinue lorsque le tube est extrait, suivant les cas. Les formes des vésicules dépendent alors du scénario utilisé pour tirer : avec une "force constante" en faisant varier la distance entre les extrémités de la vésicule, ou bien avec une "distance constante" entre les extrémités et une force croissante appliquée (fig. 2.32(E)).

²⁹déjà rencontré au paragraphe d'avant lors de la transformation prolate-poire

³⁰le rapport de la courbure non-locale sur la courbure locale $q = \bar{\kappa} / \kappa$

C. Les Vésicules Géantes Unilamellaires : système modèle de membranes biologiques

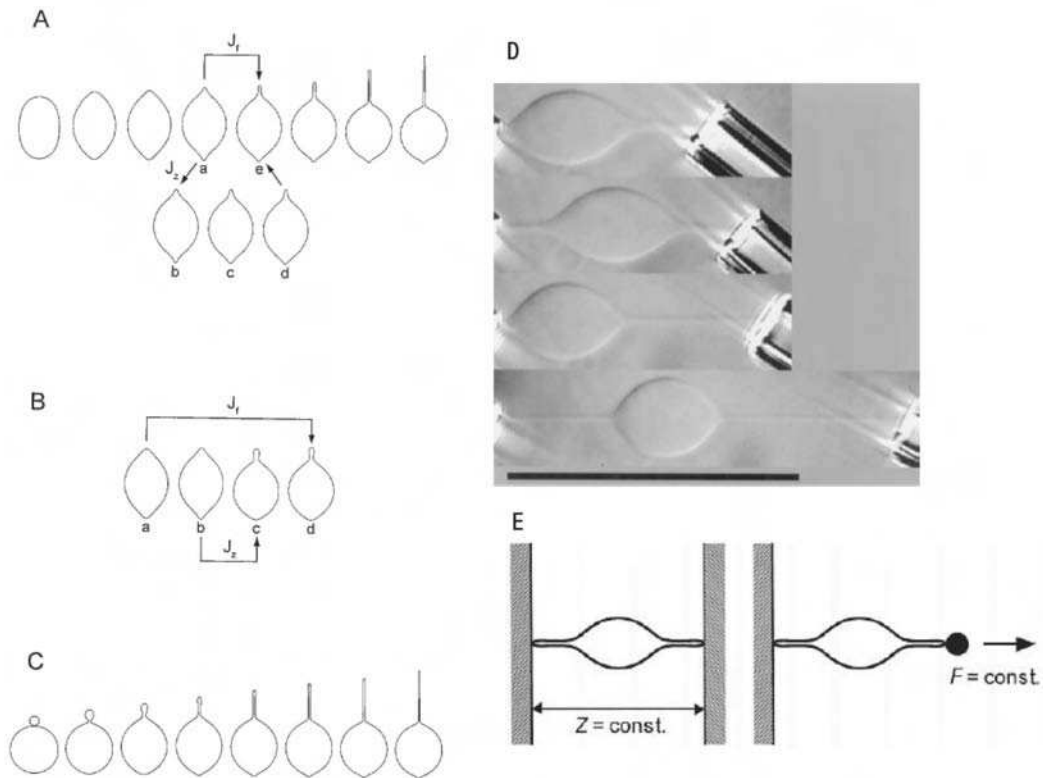


FIG. 2.32 – (A-C) Trois séries de formes de vésicules sur lesquelles est appliquée une force croissante pour trois valeurs différentes de Δa_0 , $v = 0,95$ et $q=4/\pi$ (§C.3.2) (A) $\Delta a_0 = 1,022$; (B) $\Delta a_0 = 1.7$; (C) $\Delta a_0 = 1.9$; J_f illustre ce qui se passe dans un scénario où le tube est tiré à force constante, J_z au contraire quand l'espacement entre les deux bouts reste constant. (D) Série de quatre photos d'une vésicule dont la membrane était attachée de part et d'autre à deux micropipettes. La vésicule allongée contient un corps central en forme de citron et des tubes de membrane, dont les rayons diminuent plus la pipette de droite s'éloigne (barre= $50 \mu m$). (E) Les deux scénarios pour extraire un tube : distance constante ou force constante, d'après [Heinrich et al., 1999].

Il est intéressant de finir cette partie sur les membranes avec cet exemple de force appliquée sur une vésicule puisqu'il permet d'étendre ce que l'on a vu sur la forme des vésicules décrites par le modèle ADE et de faire la transition avec le chapitre suivant qui va décrire en détail la formation de tubes de membrane. Nous verrons par la suite qu'il est aussi possible d'observer des formes de citrons (fixes ou oscillantes, ou donnant lieu à la formation de tubes) dans nos expériences d'extraction de tubes de membrane par des moteurs moléculaires. L'interprétation sera plus difficile que dans le cas cité précédemment puisque dans la plupart des cas, les vésicules ne sont tirées ni à force constante ni à distance constante.

Résumé

Dans ce chapitre, les constituants principaux de nos expériences de formation de tubes de membrane tirés par des kinésines à partir de vésicules géantes ont été décrits de façon quantitative. On retiendra notamment que les kinésines sont des moteurs moléculaires qui avancent le long de MT avec une vitesse caractéristique V_0 , des taux de détachement et d'attachement k_u^0 et k_b (le premier étant caractéristique et l'autre dépendant de la géométrie du système). La vitesse de la kinésine diminue lorsqu'une force est appliquée dans le sens inverse de son mouvement et son taux de détachement augmente d'une façon dépendant d'une longueur nanométrique a caractéristique de la kinésine. Elles peuvent tirer des objets auxquelles elles sont accrochées sur une distance bien plus grande que la taille de leur pas (8 nm), en consommant de l'ATP. Enfin, elles peuvent s'attacher à la membrane de vésicules, diffuser librement dans la membrane fluide avec un coefficient de diffusion D ; on s'attend à ce qu'elles puissent exercer une force sur la membrane et la déformer. La forme de la vésicule étirée sera essentiellement déterminée par son module courbure κ et sa tension de membrane σ . Les valeurs utilisées pour ces paramètres sont regroupées dans le tableau suivant 2.5; le coefficient de diffusion D_L présenté est celui des lipides dans la membrane.

| V_0 | k_u^0 | a | D_L | κ |
|---------------------|----------------------|--------|-------------------------------|------------------|
| 0,6 $\mu\text{m/s}$ | 0,42 s^{-1} | 1,3 nm | $\sim \mu\text{m}^2/\text{s}$ | 10 $K_B T$ (EPC) |

TAB. 2.5 – Tableau récapitulatif des paramètres physiques impliqués dans la formation de tube de membrane. (k_u^0 est donné pour une concentration d'ATP égale à 1 mM).

Chapitre 3

Etude théorique de l'extraction et la croissance de tubes de membrane

Nous avons vu dans le chapitre précédent que des théories de plus en plus complètes ont été mises au point pour décrire les formes d'équilibre des vésicules en l'absence de contrainte. Différentes techniques pour appliquer une contrainte sur des vésicules ont été mentionnées. Nous avons notamment vu qu'il était possible, expérimentalement, d'extraire des tubes de membrane en plaçant les vésicules dans un flux hydrodynamique, ou bien en appliquant une contrainte mécanique grâce à une micropipette ou une pince optique. Nous allons maintenant voir comment ces théories peuvent être complétées pour décrire l'extraction d'un tube de façon quasi-statique lorsqu'une force est appliquée sur la membrane. Ceci nous amènera à la description théorique de la formation et la croissance de tubes de membrane tirés par des kinésines. C'est une théorie dynamique qui intègre à la fois la physique des membranes et celle des kinésines présentées au chapitre précédent. Nous aurons alors tous les outils pour décrire comment les moteurs moléculaires peuvent coopérer pour tirer des tubes. Cette dernière partie théorique a été développée à l'Institut Curie par Otger Campàs, Jean-François Joanny et Jacques Prost suite aux expériences que j'ai réalisées sur ce système ; cependant, pour plus de clarté, la théorie est présentée dans cette partie. Elle sera ensuite confrontée aux expériences dans le dernier chapitre.

A Extraction d'un tube de membrane, statique

A.1 Les premières expériences qui ont inspiré les premières théories

Les premières expériences de formation de tubes de membrane remontent aux années 70. Elles ont été effectuées sur des globules rouges humains par Hochmuth [Hochmuth et al., 1973] : les globules étaient attachés à une surface de verre et placés dans un flux hydrodynamique. Les globules ont ensuite été aspirés dans

une micropipette (voir ch.2 §C.3.1) pour contrôler la tension de leur membrane [Hochmuth et al., 1982]. Ils ont ensuite été remplacés par des vésicules lipidiques [Waugh, 1982b, Bo and Waugh, 1989].

Dans ces expériences, les paramètres et variables accessibles à la mesure représentés figure 3.1 sont :

- la force appliquée sur la membrane pour extraire un tube \vec{f} : force exercée par un flux hydrodynamique (force de Stokes) [Waugh, 1982b], par la gravité [Bo and Waugh, 1989], par une pince magnétique [Heinrich and Waugh, 1996] ou par une pince optique [Koster et al., 2003, Cuvelier et al., 2005b]
- les paramètres géométriques : les rayons de la vésicule (ou du globule) R_v et de la pipette R_p , ainsi que la longueur de la langue aspirée dans la pipette L_p et la longueur du tube L_t , desquels il est possible d'extraire le rayon du tube de membrane R_t [Hochmuth and Evans, 1982]
- la tension de membrane σ donnée par la pression d'aspiration dans la micropipette grâce à la loi de Laplace [Hochmuth and Evans, 1982]

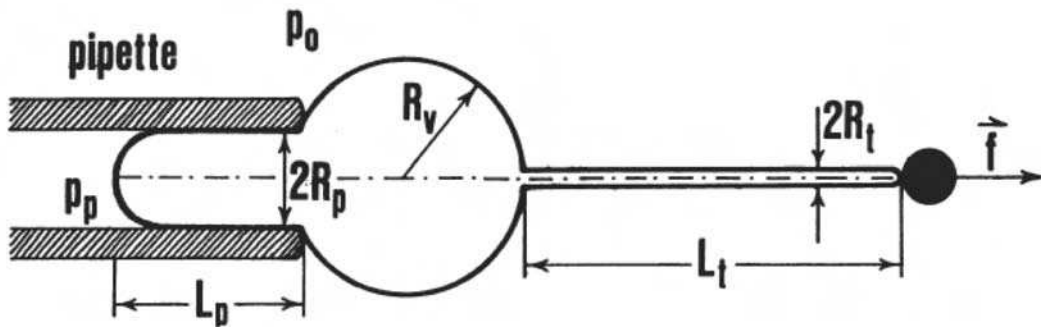


FIG. 3.1 – Schéma représentant une vésicule aspirée dans une micropipette et sur laquelle une force constante, \vec{f} , est appliquée. On observe le rayon de la pipette R_p fixé, ainsi que le rayon de la vésicule R_v , la longueur du tube L_t , la longueur de la langue L_p , et le rayon du tube R_t qui sont variables. La pression autour de la vésicule est P_0 et la pression dans la pipette est P_p . La différence de pression permet de remonter à la tension de membrane. D'après [Svetina et al., 1998].

Des théories ont été développées en parallèle aux expériences, dans les mêmes équipes, pour déduire les propriétés viscoélastiques des membranes à partir des mesures effectuées. Les propriétés sondées étaient essentiellement la rigidité de courbure et la viscosité des membranes (voir pour le globule rouge [Evans and Hochmuth, 1976, Hochmuth and Evans, 1982] et [Waugh, 1982a, Waugh and Hochmuth, 1987] pour les vésicules).

A.2 Expression analytique de la force statique nécessaire pour extraire un tube de membrane

Nous allons voir dans cette partie les différentes étapes historiques qui ont permis la détermination de la force statique nécessaire pour extraire un tube de membrane

à partir d'une vésicule.

A.2.1 Relation entre force appliquée sur la membrane et rayon du tube extrait

Plusieurs années ont été nécessaires pour décrire complètement la relation entre la force requise pour extraire un tube et les propriétés physiques de la membrane (tension σ et rigidité de courbure κ). Les premières théories visaient tout d'abord à décrire la relation entre cette force appliquée et le rayon du tube de membrane extrait. En effet, les premières expériences d'extraction de tube avaient montré que plus la force appliquée était importante, plus le rayon de tube était petit [Hochmuth et al., 1973, Hochmuth et al., 1982]. Nous allons voir dans ce paragraphe l'historique de la découverte de la relation force-rayon qu'il est intéressant de développer ; une description plus rigoureuse (et plus récente !) sera présentée au paragraphe suivant.

Tout d'abord, le **rayon du tube** (R_t) a pu être déterminé précisément grâce à l'utilisation de la technique de la micropipette. Le rayon du tube est typiquement de l'ordre de quelques dizaines de nm et invisible avec les outils de microscopie optique, il est donc très petit par rapport à celui de la vésicule (R_v) de l'ordre de la dizaine de microns. Il est raisonnable de faire les approximations de conservation de la surface [Evans and Hochmuth, 1976] et du volume de la vésicule [Hochmuth and Evans, 1982] lors de l'extraction d'un tube. La vésicule sert donc de réservoir de membrane lorsque le tube est extrait. Le rayon du tube est ensuite déduit de la relation de conservation de la surface totale et du volume, et fait apparaître la variation de la longueur de la langue L_p dans la pipette en fonction de la longueur du tube L_t , ainsi que les autres paramètres géométriques du système [Hochmuth and Evans, 1982] :

$$R_t = \left(1 - \frac{R_p}{R_v}\right) R_p \left(-\frac{dL_p}{dL_t}\right) \quad (3.1)$$

L'expression de la **force statique nécessaire pour extraire un tube**, f_0 , a été plus difficile à obtenir. Dans les premières théories développées [Waugh, 1982a, Hochmuth and Evans, 1982], la membrane était assimilée à une fine coquille de fluide homogène avec une rigidité de courbure négligeable. La force f_t obtenue en écrivant l'équilibre des forces appliquée à la vésicule qui garde une tension de membrane homogène n'était qu'une partie de la force totale nécessaire : $f_t \simeq \pi(P_v - P_0)R_v R_t$, où $(P_v - P_0)$ est la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule [Waugh, 1982a]. Ce calcul partiel montrait de plus, en utilisant la loi de Laplace $P_v - P_0 = 2\sigma/R_v$, que le produit du rayon du tube multiplié par la tension de membrane était proportionnel à la force : $f_t \simeq 2\pi R_t \sigma$.

Les calculs précédents ont ensuite été complétés dans [Bo and Waugh, 1989]. Une approche variationnelle de l'équilibre de la vésicule en présence du tube, en tenant compte de la rigidité de courbure, a permis d'obtenir l'expression totale de la force : $f_0 = \pi(P_v - P_0)R_v R_t + \pi\kappa/R_t$. Le premier terme représente la solution pour la fine coquille de fluide et le deuxième terme donne la contribution de la rigidité de

courbure. On remarque qu'en utilisant la loi de Laplace une fois de plus, l'expression de la force devient :

$$f_0 = 2\pi\sigma R_t + \frac{\pi\kappa}{R_t} \quad (3.2)$$

Cependant, il n'était pas possible de simplifier plus cette formule puisque la relation du rayon du tube en fonction de σ et κ n'était pas connue. Elle aurait pourtant pu l'être si la formule précédente 3.2 avait été mise en parallèle avec la formule obtenue précédemment par Waugh et Hochmuth [Waugh and Hochmuth, 1987].

$$f_0 = \frac{2\pi\kappa}{R_t} \quad (3.3)$$

Cette relation, qui ne fait intervenir que la rigidité de courbure de la membrane, a été montrée en modélisant la membrane par deux fines coquilles adjacentes, fluides et anisotropes. Ce nouveau modèle contrairement aux précédents, permet de décrire non seulement le processus de formation du tube mais aussi l'équilibre du tube lui-même. La formule 3.3 a été utilisée par Bo et Waugh [Bo and Waugh, 1989] pour déterminer la rigidité de courbure d'une vésicule en mesurant indépendamment la force appliquée (par gravité) et le rayon du tube (grâce à la formule 3.1)¹ (fig.3.2).

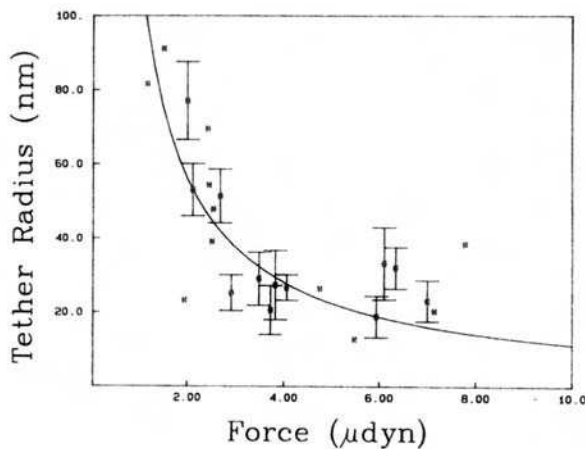


FIG. 3.2 – Rayon de tubes de membrane tirés à partir de vésicules micromanipulées en fonction de la force appliquée pour tirer le tube. L'ajustement de la courbe utilise l'équation 3.3 et permet d'obtenir la rigidité de courbure de vésicules SOPC : $44K_B T$ ou $1,8 \cdot 10^{-19}$ J, en bon accord avec des expériences plus récentes [Häckl et al., 1997] : $\kappa = 1,5 \cdot 10^{-19}$ J. D'après [Bo and Waugh, 1989].

A.2.2 Relation entre force appliquée sur la membrane et ses propriétés physiques

Bo et Waugh [Bo and Waugh, 1989] sont aussi les premiers à avoir montré que la force mesurée était déterminée uniquement par la tension de membrane (et donc la pression d'aspiration dans la pipette) pour une vésicule de rigidité de courbure donnée, indépendamment de la longueur du tube. En d'autres termes, une fois que le tube est extrait, la force nécessaire pour le maintenir ne dépend que de σ et κ , indépendamment de la longueur du tube. Ceci apparaît lorsque l'on combine les équations 3.2 et 3.3, puisqu'on obtient :

¹voir le ch.2 §C.3.1. pour un inventaire des autres techniques possibles de mesure de κ

$$\boxed{f_0 = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa} \quad R_t = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}}} \quad (3.4)$$

Le rayon d'équilibre pour des valeurs typiques de la tension et de la rigidité de courbure ($\sigma \simeq 5.10^{-5}$ N/m et $\kappa \simeq 10 K_B T$) est de l'ordre de 20 nm, valeur très petite par rapport au rayon de la vésicule (de l'ordre de 10 μ m), comme nous l'avons vu précédemment. La force statique f_0 est alors de l'ordre de 13 pN.

Plus récemment, la force nécessaire pour extraire un tube d'une vésicule micro-manipulée a été déterminée analytiquement en minimisant l'énergie d'une vésicule soumise à une force f , en supposant la surface A_0 et le volume de la vésicule V constants.

Dans la mesure où le tube de membrane est tiré très doucement (vitesse de l'ordre du micron/s), on peut supposer que la vésicule et le tube sont toujours à l'équilibre thermodynamique. On peut donc utiliser le même formalisme qu'au chapitre précédent (paragraphe C.3.2) pour déterminer la forme de la vésicule sous contrainte en prenant en compte une possible différence de distribution des lipides sur les deux feuilletts de membrane. En reprenant le Hamiltonien qui décrit l'élasticité de la vésicule (avec le tube et la langue aspirée dans la pipette) donné par le modèle ADE (eq. 2.17), et en ajoutant la contrainte appliquée pour exercer la force f , ainsi qu'un terme représentant la contribution au travail due à la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la micropipette ($\Delta p = P_0 - P_p$, la pression d'aspiration) [Bozic et al., 1992, Bukman et al., 1996], on obtient l'expression de l'énergie libre du système vésicule-tube-langue qui devient :

$$\begin{aligned} F &= F_{courb} + F_{ADE} + F_f + F_p \\ F &= \frac{1}{2} \oint \kappa (c_1 + c_2 - c_0)^2 dA + \frac{\pi \bar{\kappa}}{2A_0 d^2} (M - M_0)^2 - f L_t - \pi R_p^2 \Delta L_p \Delta p \end{aligned} \quad (3.5)$$

En minimisant cette énergie par rapport à la longueur du tube L_t et au rayon du tube R_t , on obtient une nouvelle expression de la force nécessaire pour extraire un tube f_0 , plus générale que celle de l'équation 3.4 avec la même expression pour le rayon du tube².

$$f_0 = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa} + \frac{4\pi^3 \bar{\kappa}}{A_0} (L_t - L_t^*) \quad (3.6)$$

où L_t^* caractérise l'état initial de la vésicule [Bozic et al., 1992]. $\bar{\kappa}$ a été défini au ch.2 §C.3.2. Cette minimisation n'est pourtant pas évidente. En effet, de nombreuses démonstrations publiées [Bozic et al., 1992, Heinrich and Waugh, 1996] font apparaître en plus, dans l'expression de l'énergie libre de la vésicule, l'énergie élastique d'étirement de la vésicule (avec le module de compressibilité χ présenté au chapitre précédent) ainsi que la variation de volume de la vésicule liée à l'extraction du

²Il faut noter la différence d'un facteur π entre la courbure non locale définie par Miao et al., celle utilisée dans cette thèse et celle définie dans le groupe de Svetina et al. [Svetina and Zeks, 1989, Bozic et al., 1992]

Chapitre 3. Etude théorique de l'extraction et la croissance de tubes de membrane

tube (alors que V est supposé constant). Le module élastique n'intervient finalement pas dans l'expression de la force qui est exactement la même que dans l'équation 3.6, mais nous allons voir qu'il est possible de trouver cette expression sans faire intervenir l'énergie élastique.

Encore une fois, il suffit d'écrire l'équation de conservation de la surface de la vésicule et dire que la surface utilisée dans le tube (de longueur L_t) correspond à la diminution de surface dans la langue piégée dans la pipette (variation de longueur de la langue ΔL_p) [Hochmuth and Evans, 1982]. Ceci avait conduit à l'équation 3.1. Le dernier terme énergétique F_p devient donc :

$$F_p = -\pi R_p^2 \Delta L_p \Delta p = \pi R_p (R_t \frac{R_v}{R_v - R_p} L_t) \Delta p \quad (3.7)$$

De plus, il est possible de réduire le terme de courbure (1^{er} terme de l'expression 3.5) à la simple contribution du tube; c'est en effet la partie qui "coûte" le plus en énergie. Le premier terme de l'énergie libre s'écrit donc : $F_{courb} = \pi \kappa \frac{L_t}{R_t}$. Enfin, comme la contribution principale à la variation de M (la différence d'aire entre les deux feuilletts de la membrane) lors de l'extraction du tube vient du tube lui-même, il est possible d'écrire $(M - M_0) = 2\pi d(L_t - L_t^*)$ [Bozic et al., 1992]. Le second terme énergétique de l'énergie libre à minimiser devient donc :

$$F_{ADE} = \frac{\pi \bar{\kappa}}{2A_0 d^2} (M - M_0)^2 = \frac{2\pi^3 \bar{\kappa}}{A_0} (L_t - L_t^*)^2 \quad (3.8)$$

L'énergie libre du système a finalement comme expression :

$$F = \pi \kappa \frac{L_t}{R_t} + \frac{2\pi^3 \bar{\kappa}}{A_0} (L_t - L_t^*)^2 - f L_t + \pi \frac{R_v R_p}{R_v - R_p} R_t L_t \Delta p \quad (3.9)$$

En minimisant l'énergie libre du système ($\partial F / \partial R_t = 0$ et $\partial F / \partial L_t = 0$), et en tenant compte de l'expression de la différence de pression Δp qui fixe la tension de membrane [Hochmuth and Evans, 1982], R_p et R_v étant des constantes :

$$\Delta p = \frac{2(R_v - R_p)}{R_v R_p} \sigma \quad (3.10)$$

on obtient l'expression de la force f_0 recherchée (eq. 3.6).

Evans et Young [Evans and Yeung, 1994] ont trouvé la même expression statique de la force f_0 (eq. 3.6) en écrivant l'équilibre des forces appliquées sur les deux feuilletts de la membrane. Ils ont montré en plus qu'on pouvait ajouter un terme dynamique qui traduit le couplage entre les feuilletts lorsque le tube est extrait rapidement (en $bd^2 \ln(R_v/R_t) \dot{L}_t$, où b est un coefficient de viscosité phénoménologique qui traduit la dissipation entre les feuilletts). Ce terme dynamique est négligeable dans nos expériences de formation de tubes tirés par des kinésines (de l'ordre du $\mu m/s$). Je vous renvoie donc à l'article d'Evans pour plus de détails.

A.2.3 Influence de la courbure non locale

Les expériences très propres de Heinrich et Waugh [Heinrich and Waugh, 1996] montrent que la force f nécessaire pour extraire un tube dépend linéairement de la racine carrée de la tension de membrane σ et est indépendante de la longueur du tube L_t (fig. 3.3). Le deuxième terme dans l'expression de la force (eq. 3.6) faisant intervenir la courbure non locale $\bar{\kappa}$ et représentant la dilatation différentielle ($L_t - L_t^*$) entre les deux feuilletts de la membrane du tube ne semble pas avoir d'influence. Les auteurs donnent comme justification que pour accéder au deuxième terme de la force (eq. 3.6), il faut tirer des tubes beaucoup plus longs, ce qui n'était pas possible avec leur système expérimental.

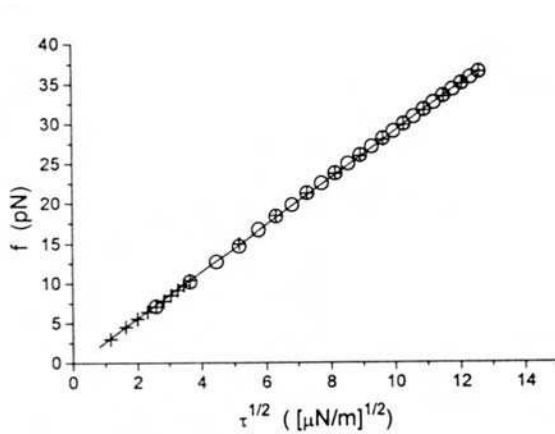


FIG. 3.3 – Données expérimentales montrant la dépendance linéaire de la force nécessaire pour extraire un tube f en fonction de la racine carrée de la tension de membrane σ . D'après l'équation 3.6, si le second terme est négligeable, la pente de la droite est égale à $2\pi\sqrt{2\kappa}$. Il est donc possible d'extraire la rigidité de courbure de vésicules SOPC $\kappa = 1,17 \cdot 10^{-19}$ J = $29 K_B T$. D'après [Heinrich and Waugh, 1996].

L'explication de leurs observations a été apportée un peu plus tard par Raphael et Waugh [Raphael and Waugh, 1996]. Ils ont en effet montré que le terme de dilatation différentielle ($L_t - L_t^*$) entre les deux feuilletts disparaît par relaxation. Le transport de lipides entre les feuilletts (flip-flop, voir ch.2 §C.2.2) est largement accéléré par rapport à l'état d'équilibre lorsqu'un tube est tiré mécaniquement. La différence de surface supplémentaire entre les feuilletts créée par l'extraction du tube, liée à une différence de nombre de lipides entre les feuilletts, diminue grâce à ce transfert de lipides. Pour expliquer cette accélération du flip-flop qui se fait via la présence de défauts dans la membrane [Devaux, 1991], les auteurs donnent comme argument que les défauts se déplacent plus vite lorsque la membrane est tirée mécaniquement que par diffusion; ce qui accélère d'autant le transport de lipides (voir aussi [Svetina et al., 1998]). Pour illustrer leurs arguments, ils ont mesuré le temps caractéristique de relaxation qui correspond au coefficient de perméation entre les feuilletts. Les résultats sont représentés figure 3.4. Ils trouvent un temps caractéristique de l'ordre de 86 s; ce qui signifie que, aux échelles de temps auxquelles nous travaillons, ces effets de flip-flop auront toujours lieu et que nous ne serons pas capables de voir les effets de courbure non locale.

En conclusion, l'expression de la force nécessaire pour extraire un tube d'une vésicule aspirée dans une pipette est simplement donnée par l'expression 3.4, en accord avec les observations de Bo et Waugh [Bo and Waugh, 1989]. Pour une étude

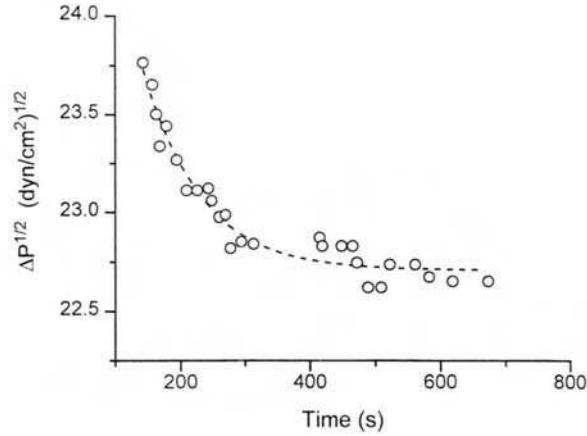


FIG. 3.4 – Variation temporelle de la pression d’aspiration dans la micropipette pour maintenir un tube à une petite longueur après une longue extension. Un très long tube (environ $600 \mu m$) commence par être extrait de la vésicule par gravité, puis il est réaspiré en augmentant beaucoup la pression d’aspiration dans la pipette. Quand le tube a atteint une petite longueur, la pression d’aspiration est continuellement réajustée pour maintenir cette longueur constante. La courbe représente la variation temporelle de la racine carrée de la pression d’aspiration Δp . La ligne pointillée correspond à l’ajustement par une exponentielle. Le temps caractéristique de relaxation mesuré pour le tube représenté est de 86 s. D’après [Raphael and Waugh, 1996].

de la stabilité mécanique du tube, voir [Bukman et al., 1996].

A.3 Formation et croissance de tubes de membrane

A.3.1 Forme d’un tube de membrane

Il est possible d’adopter un point de vue théorique plus simple pour décrire l’extraction d’un tube de membrane (voir les travaux de [Derényi et al., 2002] et parallèlement [Powers et al., 2002]). Il s’agit alors de tirer de façon ponctuelle sur une membrane de vésicule qui a une tension donnée σ . Il n’y a plus de micropipette. L’énergie libre de la vésicule est alors simplement donnée (pour toutes les raisons données au paragraphe précédent) par :

$$F = \oint \frac{\kappa}{2} (2H)^2 dA + \sigma A - pV - fL \quad (3.11)$$

où H est la courbure moyenne $(c_1 + c_2)/2$ et L la distance entre la membrane et l’extrémité du tube, A l’aire et V le volume de la vésicule. Le tube est tiré dans la direction Z avec une force f . p est la pression intérieure de la vésicule (relative par rapport à l’extérieur). Les auteurs ont décidé de travailler à surface et pression constantes plutôt qu’à aire et volume constants, puisque cela reflète plus la réalité expérimentale.

La minimisation de l'énergie libre du tube (à $p=0$) donnée par $F_{tube} = [\kappa/(2R_t^2) + \sigma]2\pi R_t L_t - f L_t$ redonne les expressions eq. 3.4 pour la force et le rayon du tube appelés ici f_0 et R_0 (f et R sont des variables). Il est clair avec cette expression de l'énergie libre du tube que la tension tend à réduire le rayon du tube alors que la rigidité de courbure tend à l'augmenter.

Derényi et al. ont de plus résolu analytiquement l'équation donnant la forme du tube extrait. Ils se réduisent aux surfaces axisymétriques (d'axe de révolution z , direction dans laquelle le tube est tiré) et utilisent les coordonnées $R(S)$ et $Z(S)$ pour décrire la position de la membrane. S est l'abscisse curviligne (fig. 3.5 A) et $\psi(S)$ est l'angle qui permet de paramétrer la membrane.

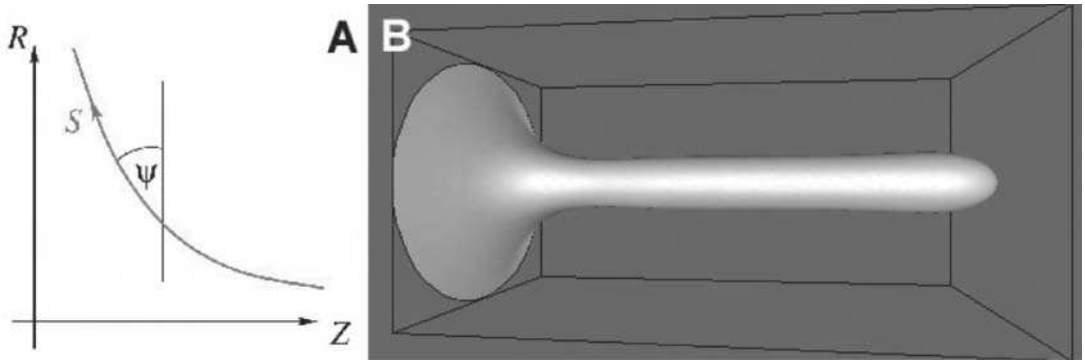


FIG. 3.5 – (A) Paramétrisation de la membrane (en rouge) dans le plan R - Z , où Z est la direction dans laquelle le tube est tiré et R la distance à l'axe de révolution (axe z). S est l'abscisse curviligne. La position de la membrane est déterminée par les coordonnées $R(S)$ et $Z(S)$, ainsi que l'angle $\psi(S)$. (B) Forme tridimensionnelle d'un tube obtenue par résolution numérique de la minimisation de l'énergie libre de la membrane. D'après [Derényi et al., 2002].

La forme de la membrane est obtenue par la méthode variationnelle à partir de l'expression de l'énergie libre 3.11 [Julicher and Seifert, 1994], en utilisant la paramétrisation introduite. Les détails du calcul sont présentés dans [Derényi et al., 2002], le résultat obtenu pour la déformation de la membrane à petite force (avant que le tube ne soit formé), dans l'approximation linéaire, est donnée par l'équation :

$$Z_{lin} = Z_0 - \frac{2R_0 f}{f_0} \left[\ln \left(\frac{R}{\sqrt{2}R_0} \right) + K_0 \left(\frac{R}{\sqrt{2}R_0} \right) \right] - \frac{R^2}{2R_{ves}} \quad (3.12)$$

où Z_0 est une constante d'intégration qui sert de coordonnée de référence, $R_{ves} = 2\sigma/p$ le rayon de la vésicule, R_0 le rayon du tube, et $K_0(R)$ est la première fonction de Bessel modifiée. Les contributions de κ , σ et p sont incluses dans f_0 , R_0 et R_{ves} . Le dernier terme n'est qu'une contribution triviale décrivant la forme sphérique d'une vésicule mise sous tension avec une pression p ; sa contribution à la formation du tube est négligeable. Le deuxième terme, qui est proportionnel à f , correspond à la réponse linéaire; il décrit la déformation de la vésicule. Pour $p=0$ et de grandes

valeurs de R , le logarithme domine, la forme du tube tend alors vers une caténoïde³.

Pour les plus grandes forces, l'approximation linéaire n'est plus applicable et l'équation différentielle donnée par la minimisation de l'énergie libre de la vésicule doit être résolue numériquement. Cependant, l'équation 3.12 reste vraie loin du tube, pour les faibles valeurs de l'angle ψ . Les solutions sont obtenues en négligeant le terme de pression à l'origine de la forme sphérique de la vésicule. On peut alors décrire la membrane comme une membrane plane de taille très grande par rapport à celle du tube avec une courbure initiale nulle et une tension de membrane fixée ; elle est placée en $Z=0$. La figure 3.6 représente un tube tiré avec différentes longueurs.

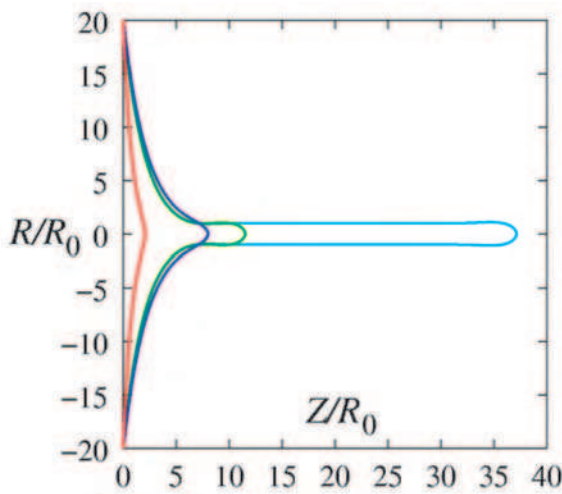


FIG. 3.6 – Forme d'un tube tiré à partir d'une membrane de tension $\sigma = 5.10^{-5}$ N/m et de rigidité de courbure $\kappa = 10 K_B T$. Différentes longueurs sont représentées (normalisées par le rayon du tube R_0). L'équation 3.12 donne une très bonne approximation de la forme pour les faibles déformations (courbe en rouge). D'après [Derényi et al., 2002].

A.3.2 Courbe force-longueur de tube à tension constante

La minimisation de l'énergie libre de la membrane de surface πR_{ring}^2 lorsqu'une force est appliquée permet aussi d'accéder à la relation entre la force appliquée et la longueur du tube. Différentes solutions sont représentées figure 3.7.

Il est intéressant de remarquer la non monotonie des différentes courbes force-longueur de tube. D'abord, la force augmente linéairement avec la force f , en accord avec l'équation 3.12 ; la pente dépend de σ et de la taille de la membrane R_{ring} . La force tend ensuite rapidement vers la force f_0 , qui est la force nécessaire pour extraire et maintenir un tube de membrane. La force est alors bien indépendante de la longueur du tube, comme l'avaient remarqué Bo et Waugh [Bo and Waugh, 1989]. Ce qui était plus difficile à prévoir, c'est la présence de l'"overshoot" au moment de la formation du tube (la bosse). Il faut donc fournir une force plus grande pour former le tube que celle nécessaire pour l'allonger. La taille de l'"overshoot" dépend des valeurs prises pour σ et κ , et est de l'ordre de $0,13f_0$ dans des conditions raisonnables ($\sigma = 5.10^{-5}$ N/m et $\kappa = 10 K_B T$). La présence de l'"overshoot" et des petites oscillations qui le suivent sont les signatures d'une **transition de forme du premier ordre** (entre la forme simplement déformée et la forme avec un tube tiré) à la force f_0 , où f et non pas L est le paramètre d'ordre.

³forme connue des films de savon dans une géométrie cylindrique en l'absence de pression

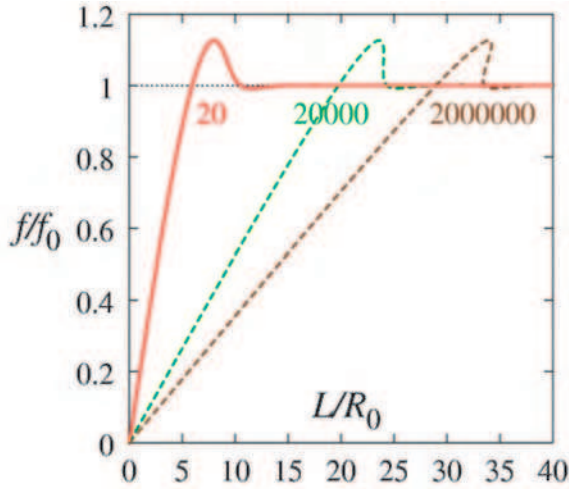


FIG. 3.7 – Diagramme force-déformation pour différentes valeurs de la taille de la membrane R_{ring} normalisée par le rayon du tube R_0 . La force est normalisée par la force statique f_0 et la déformation depuis la surface de la membrane ($Z=0$) par R_0 . Les courbes ont été obtenues numériquement. Ici encore, $\sigma = 5.10^{-5}$ N/m et $\kappa = 10$ $K_B T$. La taille de l'overshoot dépend de ces valeurs initiales; ici il est de l'ordre de $0,13f_0$. D'après [Derényi et al., 2002].

La figure 3.7 montre que dans la zone où L augmente linéairement avec la force f , L augmente aussi avec la taille de l'anneau de membrane R_{ring} . Le pic principal finit par surplomber le plateau de force f_0 (pour $R_{ring}/R_0 > 20\,000$) et devient instable, donnant lieu à une transition de phase de premier ordre dans l'espace des L cette fois. La transition f_{max}/f_0 devient discontinue.

La courbe force-longueur de tube a été mesurée expérimentalement (par pinces optiques), à tension constante, dans [Cuvelier et al., 2005b]. L'overshoot avait été observé initialement dans [Koster et al., 2003] mais la tension n'était pas contrôlée. Plus tard, Koster et al. ont montré que la hauteur dépend non seulement de σ et κ , mais aussi de la taille du patch d'adhésion; c'est-à-dire de la surface sur laquelle la force est appliquée qui ne peut en effet jamais être ponctuelle [Koster et al., 2005]. Ils ont montré expérimentalement, analytiquement et par des simulations que la force maximum (en haut de la bosse) augmente linéairement avec le rayon de la surface d'adhésion [Koster et al., 2005].

Pour finir, on peut remarquer que *in vivo* ou *in vitro*, les moteurs moléculaires exercent une force non ponctuelle (grâce notamment à la présence de domaines protéiques ou lipidiques par l'intermédiaire desquels les moteurs peuvent s'accrocher à la membrane). Ceci permet de donner une longueur de coupure naturelle à la densité d'énergie qui divergerait sinon à l'extrémité du tube [Derényi et al., 2002]. Cette divergence d'énergie permet cependant de prédire que l'extrémité du tube est l'endroit le plus propice à une rupture de la membrane. Ceci n'est pas sans conséquence au niveau du trafic intracellulaire.

A.3.3 Relation force-longueur de tube à tension non fixée

Dans tout le paragraphe précédent, il faut noter que dans toute l'analyse théorique présentée au paragraphe précédent, on suppose que la tension reste constante lors de l'extraction du tube. Ceci est vrai pour les expériences où la tension de la vésicule est fixée par une micropipette, ou quand il existe un réservoir de membrane

permettant de "tamponner" l'extension d'un tube. Il a été montré récemment au laboratoire que, quand un long tube est extrait d'une vésicule fortement adhéree sur une surface et avec une tension non fixée, la force augmente de façon substantielle avec la longueur du tube [Cuvelier et al., 2005a].

L'expression de la longueur du tube L en fonction de la force appliquée f dans le cas général (valable à la fois dans les régimes entropique et enthalpique de tension de la membrane⁴) est donnée par :

$$L \simeq R_v \frac{f R_v}{16\pi\kappa} \left[\frac{K_B T}{\kappa} \ln \left(\frac{f}{f_0} \right) + \frac{f^2 - f_0^2}{\pi\kappa\chi} \right] \quad (3.13)$$

où f_0 est la force à la plus petite longueur de tube (juste après l'"overshoot"), et χ est le module de compressibilité de la membrane.

A.3.4 Coalescence de deux tubes

Il a été observé expérimentalement que lorsque deux tubes de membrane sont extraits de la même vésicule, ils ont tendance à coalescer lorsqu'ils sont suffisamment proches [Evans et al., 1996] : les deux tubes s'attirent et se transforment en un tube unique à la base et en deux branches au-delà de la jonction (fig. 3.8).

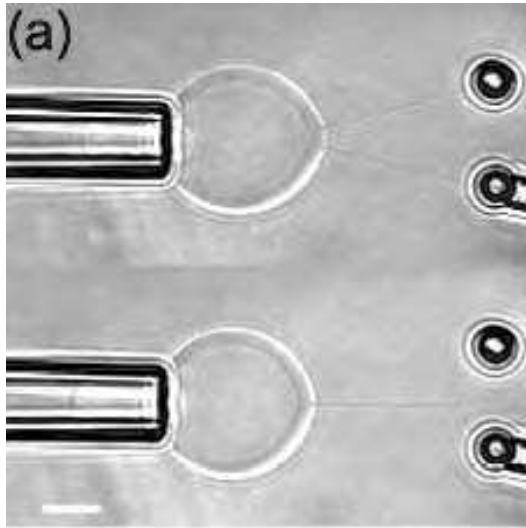


FIG. 3.8 – (a) Vidéomicrographes montrant la coalescence de deux tubes extraits d'une vésicule micromanipulée. L'image du haut montre la configuration en "V" des tubes antérieure à la coalescence. L'image du bas montre la configuration en "Y" des tubes après coalescence, lorsque la pipette a été suffisamment reculée des extrémités fixes des tubes. D'après [Cuvelier et al., 2005b].

Ce phénomène de coalescence peut être expliqué grâce à la théorie développée au paragraphe A.3.1 (voir une analyse quantitative dans [Cuvelier et al., 2005b]). En effet, lorsque les tubes se rapprochent (quand la vésicule est éloignée des extrémités fixes des tubes), la caténoïde (terme logarithmique de l'expression 3.12), qui décrit la forme du tube au niveau de sa connexion avec la membrane, se déforme du côté de l'autre tube. Cette dissymétrie crée une force attractive entre les tubes, qui donne une contribution énergétique au système des deux tubes égale à $2R_t F_t \ln(2l)$. R_t est toujours le rayon du tube et F_t est la force nécessaire pour maintenir ce tube, que l'on sait être indépendante de la longueur du tube à tension fixée et l la demi-distance

⁴voir ch.2 §C.3.1

entre les deux tubes au niveau de la vésicule (voir fig. 3.9(A) pour la définition des paramètres géométriques). Lorsque les tubes se rapprochent, la longueur de chacun est plus grande que la longueur qu'ils auraient s'ils étaient infiniment éloignés, c'est-à-dire lorsqu'ils ont une position radiale. Cette longueur devient : $(R_v\theta - l)^2/2R_v$, au lieu de $R_v\theta$ (fig. 3.9(A)). Cette déviation nécessite un travail égal à : $2(R_v\theta - l)^2/2R_v F_t$, qui correspond à une force répulsive entre les tubes. L'énergie totale qui caractérise les deux tubes vaut :

$$E = 2R_t F_t \ln(2l) + 2 \frac{(R_v\theta - l)^2}{2R_v} F_t \quad (3.14)$$

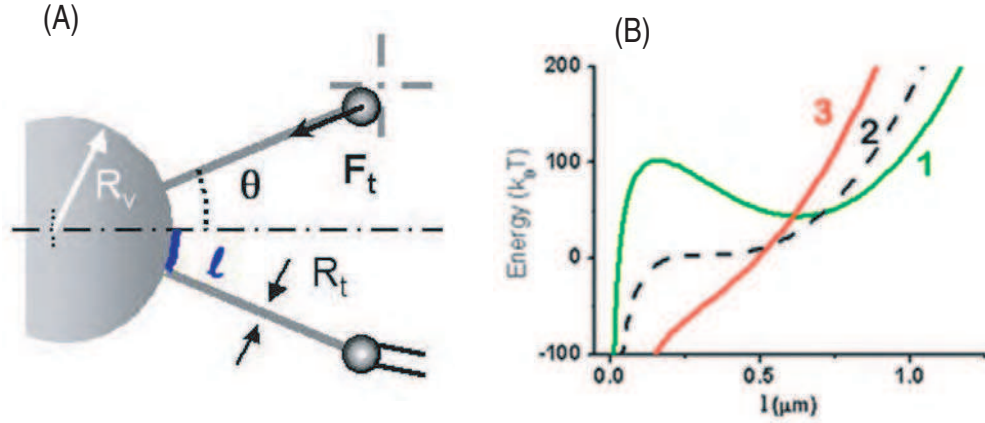


FIG. 3.9 – (A) Paramètres géométriques décrivant la coalescence de deux tubes extraits d'une vésicule aspirée dans une micropipette (qui a donc une tension contrôlée et constante). R_t est le rayon du tube, R_v celui de la vésicule, F_t est la force nécessaire pour maintenir le tube, θ l'angle entre un tube et le plan de symétrie et l la distance entre le col du tube et ce plan. (B) Courbes donnant l'énergie du tube dans les situations (1) lorsque les deux tubes coexistent en configuration "V", (2) quand les tubes coalescent et (3) quand les tubes ont déjà coalescé et sont en configuration "Y". Pour passer de la courbe 1 à la courbe 3, il suffit de diminuer l'angle entre les tubes en reculant la pipette. D'après [Cuvelier et al., 2005b].

La figure 3.9 montre l'énergie des deux tubes pour différentes valeurs de θ . Quand les tubes sont éloignés (situation 1), aux grands θ , une barrière énergétique de plusieurs dizaines de $K_B T$ empêche les tubes de coalescer (et avoir $l=0$). En revanche, pour les faibles valeurs de θ , seule la valeur triviale $l=0$ minimise l'énergie (situation 3). On comprend donc que pour avoir un minimum de l'énergie qui ne corresponde pas à la valeur non triviale $l=0$, il faut se placer dans la situation 2, quand la barrière d'énergie présente en (1) s'annule juste. La minimisation de E par rapport à l donne le polynôme du 2ème degré en l :

$$l^2 - (R_v\theta)l + R_v R_t = 0 \quad (3.15)$$

La situation 2 de la figure 3.9 correspond au cas où la racine du polynome 3.15 est double. On obtient ainsi l'expression de l'angle θ_c et la distance l_c au moment de la coalescence :

$$\theta_c = 2\sqrt{\frac{R_t}{R_v}} \quad l_c = \frac{1}{2}R_v\theta \quad (3.16)$$

Une application directe de ces expériences de coalescence de tubes est la mesure de la rigidité de courbure de vésicules en phase liquide ordonnée (contenant par exemple un mélange équimolaire SM/cholestérol, voir ch.2 §C.2.2). En effet, $\kappa = F_t R_v \theta_c^2 / 8\pi$, donc une mesure de F_t et θ_c donne κ indépendamment de la tension de membrane. Cette valeur trouvée, de l'ordre de $65 K_B T$ pour les vésicules SM/cholestérol 1 :1 nous sera très utile pour nos études postérieures de tubes tirés à partir de vésicules rigides. Nous verrons par la suite qu'il est aussi possible d'observer des phénomènes de coalescence dans nos expériences où les tubes de membrane sont tirés par des kinésines.

Nous venons de voir qu'il est possible de tirer des tubes de membrane à partir de vésicules lipidiques en appliquant une force f de façon quasi-ponctuelle et quasi-statique sur la membrane. Pour des valeurs typiques de la tension de membrane ($\sigma = 5.10^{-5}$ N/m), et de la rigidité de courbure ($\kappa = 10 K_B T$), cette force est de 13 pN. Si maintenant la force est exercée par des kinésines attachées directement à la membrane, que se passe-t-il? Pourquoi les lipides ne sont-ils pas simplement arrachés de la membrane? Nous avons vu de plus qu'une kinésine pouvait exercer au maximum une force de 6 pN (ch.2 §B.1.3). Dans quelle mesure les kinésines peuvent-elles s'associer pour fournir la force nécessaire à la formation d'un tube? C'est ce que la théorie développée en parallèle à nos expériences a réussi à expliquer.

B Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

B.1 Pourquoi les lipides ne sont pas arrachés de la membrane par les kinésines

Avant de comprendre comment les kinésines peuvent déformer suffisamment la membrane pour extraire un tube, nous devons d'abord comprendre pourquoi, dans les expériences que j'ai réalisées, elles n'extraient pas simplement les lipides auxquels elles sont directement attachées grâce à la liaison streptavidine-biotine⁵. En effet, les forces déployées par les kinésines sont comparables à celles nécessaires pour extraire un lipide [Ludwig and Evans, 2000]. Pour répondre à cette question, il faut comparer les temps de vie de la liaison kinésine-MT et ceux d'un lipide biotinylé inséré dans une membrane, lorsqu'une force est appliquée sur ces liaisons.

⁵les kinésines sont biotinylées, elles s'attachent aux lipides biotinylés de la membrane via une streptavidine (voir chapitre suivant pour le protocole exact).

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

B.1.1 Temps de vie de la liaison kinésine-microtubule

Dans le cas de liaison kinésine-MT, nous avons vu au paragraphe B.3.3 du chapitre 2 que le taux de détachement kinésine-MT augmentait exponentiellement avec la force rétrograde appliquée sur la kinésine. La dépendance, donnée par la théorie de Kramers [Kramers, 1940] est donnée par l'équation 2.4. Comme le temps de vie de la liaison (τ_{K-MT}), c'est-à-dire le temps moyen au bout duquel la kinésine se détache spontanément du MT, est simplement l'inverse du taux de détachement, on peut le calculer en prenant l'inverse de la formule 2.4 :

$$\tau_{K-MT}(F) = \tau_{K-MT}^0 \exp\left(-\frac{Fa}{K_B T}\right) \quad (3.17)$$

où $\tau_{K-MT}^0 = 1/k_u^0 = 2,4$ s est le temps de vie en l'absence de force appliquée, F la force appliquée et $a=1,3$ nm [Schnitzer et al., 2000]. On peut par exemple calculer le temps de vie de la liaison lorsqu'une force de l'ordre de la force d'arrêt de la kinésine est appliquée (6 pN). Avec les valeurs données précédemment, on obtient un temps de vie de l'ordre de $\tau_{K-MT} \simeq \mathbf{0,3}$ s.

B.1.2 Temps de vie d'un lipide biotinylé dans une membrane lipidique

Dans le cas de la liaison lipide-membrane, là encore il faut tenir compte de la force appliquée sur la liaison. Il est important de remarquer que la force du lien dépend de la vitesse à laquelle on applique la force : plus on tire vite et plus la force à appliquer pour casser la liaison doit être importante. Ces observations sont bien expliquées par la théorie de Kramers. Il n'est pas nécessaire de rentrer dans les détails ici, je vous renvoie aux travaux de Evan Evans [Evans et al., 1995, Evans and Ritchie, 1997] (voir aussi la revue [Evans, 2001]) qui a mis au point une technique de Spectroscopie Dynamique de Force pour sonder ces effets de vitesse de force appliquée sur la force de rupture d'une liaison. Cette technique appelée "Biomembrane Force Probe" utilise un globule rouge comme capteur de force. Le globule est fixé à une bille couverte du ligand testé ; le tout est mis en contact avec une bille couverte du récepteur associé au ligand testé ou bien avec une vésicule dans le cas où la liaison d'un lipide dans une membrane est étudiée. Le globule et la deuxième bille (ou vésicule) sont maintenus grâce à deux micropipettes mises face à face (fig. 3.10). Lorsque le globule et la bille centrale sont éloignés de façon contrôlée de l'objet sondé, il est possible de mesurer la force croissante appliquée sur la liaison entre la bille centrale et l'objet (connaissant la position de la bille et l'élasticité du globule) jusqu'à rupture de la liaison. Pour sonder une liaison unique, il suffit de diminuer au maximum la quantité de ligands et de récepteurs situés à la surface des billes (ou vésicule).

Evans et al. ont notamment étudié l'influence de la force appliquée sur le taux de dissociation d'un lipide d'une membrane. Ils ont utilisé comme sonde le lipide diC14-PE-PEG-biot (deux chaînes de 14 carbones, une tête PE et un tag PEG-biotine⁶). Ce lipide est placé dans une membrane de vésicule SOPC-cholestérol. Les

⁶Le PEG, poly-éthylène-glycol est un long polymère inséré entre le lipide et la biotine. Il sert d'espaceur et permet de rendre la liaison avec la biotine plus mobile. En toute rigueur, il faudrait



FIG. 3.10 – Principe de la "Biomembrane Force Probe". Une bille est attachée à un globule rouge aspiré dans une micropipette, utilisé comme capteur de force. La bille est mise en contact de façon contrôlée avec l'objet récepteur (bille ou vésicule) puis éloignée. L'enregistrement de la position de la bille centrale ainsi que la déformation du globule rouge permet de remonter à la force de rupture de la liaison entre la bille et l'objet. D'après [Merkel et al., 1999].

résultats obtenus sont représentés figure 3.11 (A) (disques rouges). Les triangles bleus représentent les résultats obtenus lorsque seule la liaison avidine-biotine est sondée.

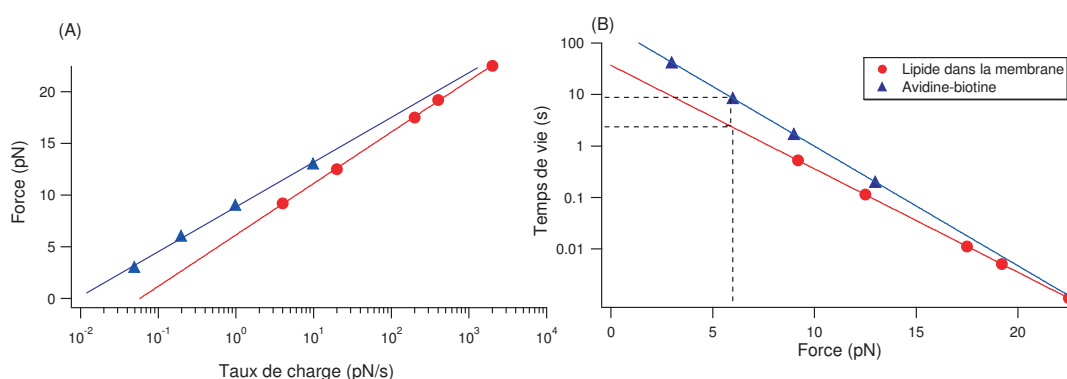


FIG. 3.11 – (A) Force d'arrachage d'un lipide de la membrane (disques rouges) ou force de rupture de la liaison avidine-biotine en fonction du taux de charge (taux d'accroissement de la force appliquée en fonction du temps). Les lignes continues correspondent aux fits logarithmiques donnés par l'équation 3.18. (B) Temps de vie d'un lipide dans une membrane (disques rouges) ou de la liaison avidine-biotine (triangles bleus) en fonction de la force appliquée. Les lignes continues correspondent aux fits exponentiels donnés par l'équation 3.20. D'après [Merkel et al., 1999, Evans, 2001].

Pour calculer le temps de vie de la liaison, τ_{lip} , en fonction de la force de rupture, f^* , connaissant la relation entre la force de rupture et le taux de charge, r_t (taux de croissance de la force appliquée avec le temps, dépend de la vitesse d'éloignement et de l'élasticité du globule), il faut écrire les équations suivantes [Evans, 2001] :

tenir compte de l'élasticité de cet espaceur dans les calculs de Kramers.

$$f^* = \frac{K_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{r_t \tau_{lip}^0 x_\beta}{K_B T} \right) \quad (3.18)$$

$$\tau_{lip} = \frac{K_B T}{x_\beta} \frac{1}{r_t} \quad (3.19)$$

$$\tau_{lip} = \tau_{lip}^0 \exp \left(-\frac{f^* x_\beta}{K_B T} \right) \quad (3.20)$$

où τ_{lip}^0 est le temps de vie du lipide dans la membrane en l'absence de force appliquée et x_β joue le même rôle que a dans la liaison kinésine-MT⁷. Il suffit en effet de remplacer l'expression de r_t donnée par l'équation 3.19 dans l'équation 3.18 pour obtenir l'équation 3.20, qui est similaire à l'équation 3.17 dans le cas de la liaison kinésine-MT. Un ajustement à deux paramètres des données de f^* en fonction de r_t (fig. 3.11 (A)) permet d'obtenir les valeurs de x_β et τ_{lip}^0 qu'il suffit de réinjecter dans l'équation 3.20 donnant le temps de vie τ_{lip} . On obtient alors les données représentées dans la figure 3.11 (B).

B.1.3 Comparaison : la kinésine se détache avant d'arracher un lipide

Nous pouvons remarquer que pour une valeur de force égale à 6 pN, le temps de vie d'un lipide dans la membrane est de l'ordre de **3 s**, et le temps de vie de liaison streptavidine-biotine est de l'ordre de 10 s (fig. 3.11 (B)). Sachant que les lipides biotinylés utilisés dans nos expériences ont une chaîne carbonée plus longue (18 carbones) que ceux utilisés pour tracer les courbes représentées figure 3.11, on peut supposer que leur temps de vie est encore plus élevé. De même, sachant que la liaison streptavidine-biotine utilisée est encore plus forte que la liaison avidine-biotine, le temps de vie est aussi plus élevé. En remarquant que ces temps de vie sont beaucoup plus élevés que celui de la liaison kinésine-MT, on comprend que ce sera toujours la liaison kinésine-MT qui cassera avant l'arrachage du lipide de la membrane (ou encore la rupture de la liaison streptavidine-biotine) n'ait lieu ; ce qui répond à la question posée. Cependant, c'est tout de même pour éviter que les kinésines n'arrachent les lipides qu'A. Roux et al. ont commencé par accrocher les kinésines à la membrane par l'intermédiaire de petites billes de latex (taille 200 nm) pour tirer des tubes de membrane [Roux et al., 2002].

La suite du chapitre porte sur la théorie correspondant aux expériences que j'ai réalisées sur la formation de tubes de membrane tirés par des kinésines. Dans ces expériences, de façon relativement similaire aux expériences *in vitro* réalisées précédemment, une vésicule couverte d'un nombre contrôlé de moteurs est mise en contact avec un réseau de MTs stabilisés. En présence d'ATP, les moteurs se déplacent et étant attachés à la membrane, la déforment. Nous avons cherché à déterminer quelles étaient les conditions pour qu'un tube se forme, ainsi que la

⁷ x_β caractérise la distance entre l'état lié et l'état de transition avant l'état non lié (voir fig. 2.15).

distribution des moteurs le long du tube une fois qu'il est tiré. Une étude théorique en champ moyen effectuée au laboratoire a permis de coupler la dynamique des moteurs et la physique d'extraction de tubes.

B.2 Présentation du système vésicule-tube de membrane

B.2.1 Géométrie du système

Pour décrire théoriquement l'extraction d'un tube de membrane, on sépare le système en quatre parties (voir la géométrie du système fig. 3.12 à 2D) :

- **la vésicule** (GUV) qui sert de réservoir de membrane et de moteurs moléculaires. Ces moteurs sont fixés à la membrane à une concentration initiale surfacique ρ_∞ connue.
- **la région de connexion vésicule-tube**, qui fait un angle avec la surface où se trouve le MT⁸. Cette partie du tube de membrane est recouverte de moteurs. Comme elle ne touche pas le MT, ces moteurs sont non liés au MT et diffusent simplement dans la membrane. Leur densité dans la jonction est notée ρ_u (densité à 1D).
- **le tube**, recouvert de moteurs attachés à la membrane. Certains moteurs sont aussi liés au MT et avancent en consommant de l'ATP. Les autres ne sont pas liés au MT ; ils diffusent librement à la surface de la membrane avec un coefficient de diffusion D et sont convectés par le tube qui croît. Les deux populations sont décrites par leur densité linéique : ρ_b pour les moteurs liés (sous-entendu au MT), ρ_u pour les moteurs non liés. Ces densités dépendent de la distance x par rapport au bout du tube (fig. 3.13).
- **le bout du tube**, qui est la région où les moteurs tirent effectivement le tube. Là encore on distingue deux populations de moteurs : n_b est le nombre de moteurs liés au MT qui tirent le tube, n_u est le nombre de moteurs non liés dans cette région (fig. 3.13).

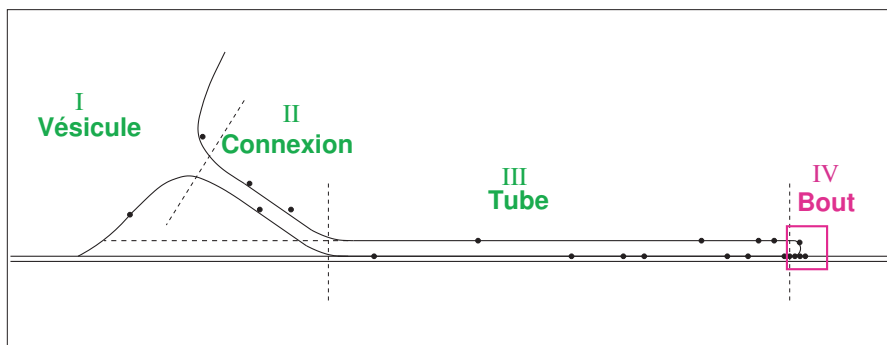


FIG. 3.12 – Représentation schématique du système séparé en quatre parties : la vésicule, la région de connexion vésicule-tube, le tube et le bout du tube. Dessin de O. Campàs.

⁸on verra au ch.5 que cette géométrie correspond aux observations expérimentales

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

B.2.2 Nécessité d'une accumulation dynamique des moteurs au bout du tube

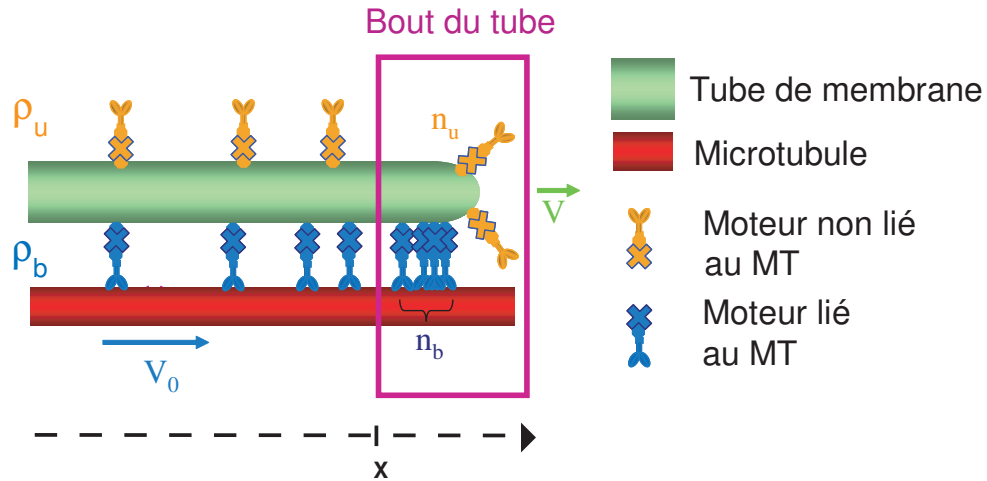


FIG. 3.13 – Représentation schématique de l'extrémité d'un tube de membrane. On distingue deux populations de moteurs fixés à la membrane : les moteurs liés aussi au MT (bleus) et ceux qui ne sont pas liés au MT (jaunes). Les moteurs liés au MT, le long du tube de membrane, avancent à la vitesse V_0 des moteurs en l'absence de force appliquée, contrairement aux moteurs liés du bout du tube. Ceux-ci tirent effectivement le tube et avancent donc à la vitesse V du tube plus petite que la vitesse V_0 . Il y a donc une accumulation dynamique des moteurs au bout du tube.

Il est important de remarquer que les moteurs liés au MT et situés le long du tube ne sont pas capables d'exercer une force importante sur la membrane (et réciproquement). En effet, comme la membrane peut être considérée comme un fluide à deux dimensions (cf. ch2. §C.2.2), elle ne peut supporter de contrainte de cisaillement exercée par les moteurs. Pour justifier cette remarque, on peut évaluer la force de friction F_H exercée par la membrane sur un moteur. En utilisant la loi d'Einstein, le coefficient de friction ξ est donné par $\xi = K_B T / D$, où D est le coefficient de diffusion des moteurs à la surface de la vésicule de l'ordre du $\mu m^2/s$. La force de friction est donnée par l'expression : $F_H = \xi V_0 = \frac{K_B T}{D} V_0$; elle est de l'ordre de $10^{-3} pN$ pour une vitesse des moteurs de l'ordre du $\mu m/s$ (voir ch.2 §B.1.3); elle est donc bien négligeable par rapport à la force d'arrêt des kinésines (environ 6 pN). De plus, si on somme la force exercée par tous les moteurs liés le long du tube (il suffit de multiplier par la densité de moteurs liés et la longueur du tube considéré), on remarque que cette force est bien négligeable devant la force nécessaire pour tirer le tube F_0 . Cette hypothèse reste vraie dans la mesure où l'on travaille à basse densité de moteurs (quelques centaines par μm^2) et pour des tubes pas trop longs (quelques dizaines de microns).

Ainsi, seuls les moteurs situés au bout du tube exercent vraiment une force sur la membrane puisque c'est l'endroit où la courbure est la plus importante et où

ils peuvent appliquer une force normale à la bicouche. On a vu au chapitre 2 que la vitesse des moteurs (§B.2.4) décroît avec la force extérieure appliquée en sens inverse de leur mouvement ; on peut donc supposer que les moteurs situés au bout du tube sont freinés par rapport aux moteurs situés le long du tube. Ces derniers avancent à la vitesse V_0 des kinésines en l'absence de force appliquée alors que les moteurs qui tirent avancent à la vitesse V inférieure à V_0 (fig. 3.13). La différence de vitesse entre les moteurs avançant le long du tube et ceux du bout entraînent une accumulation dynamique de moteurs qui est à la base de la formation et la croissance d'un tube de membrane. Cette accumulation avait été prédite initialement mais de façon qualitative dans [Koster et al., 2003]. Nous allons voir qu'il est possible de la décrire analytiquement de façon complète et quantitative ici.

B.2.3 Vitesse du tube

La vitesse du tube V peut être assimilée à la vitesse des kinésines qui tirent le tube présentée au paragraphe précédent. Ceci n'est vrai qu'en première approximation avec la théorie de champ moyen développée ici. Cette vitesse dépend de la force statique nécessaire pour extraire un tube qu'on appellera F_0 dans toute cette partie (voir eq. 3.4, $F_0 = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa}$) et du nombre de moteurs liés qui tirent le tube (n_b) suivant l'équation :

$$V = V_0 \left(1 - \frac{F_0}{F_S} \frac{1}{n_b} \right) \quad (3.21)$$

où F_S est toujours la force d'arrêt d'une kinésine définie au chapitre 2 §B.1.3. F_0/n_b représente la force exercée sur chaque moteur puisqu'on suppose ici que tous les moteurs qui tirent se répartissent équitablement la force F_0 . L'équation 3.21 n'est donc qu'une approximation linéaire de la courbe expérimentale force-vitesse des kinésines représentée figure 2.13(A) à 1,6 mM d'ATP (concentration de saturation de la vitesse que j'ai utilisée dans mes expériences). V est maximale quand la force appliquée est nulle et s'annule pour une force par moteur égale à la force d'arrêt de la kinésine.

Nous allons maintenant écrire les équations de conservation du flux de moteurs dans les différentes régions du système et décrire leur couplage dynamique grâce aux conditions de bord, ce qui permettra de déterminer de façon auto-consistante le mouvement du tube. Commençons par étudier la dynamique du bout du tube, ce qui nous permettra de décrire les conditions nécessaires à la formation d'un tube de membrane.

B.3 Dynamique d'extraction d'un tube de membrane, étude aux temps courts

B.3.1 Bilan de flux de moteurs au niveau du bout du tube

Nous avons vu au paragraphe B.2.1 que la dynamique des moteurs moléculaires au bout du tube fait intervenir deux variables : n_b , nombre de moteurs liés au MT qui tirent le tube et n_u , nombre de moteurs non liés au MT dans cette même région. Les variations de n_b et n_u dépendent des flux suivants (fig. 3.14) :

- flux de moteurs liés, J_b , dans le bout
- flux de détachement des moteurs liés égal au produit du taux de détachement k_u par le nombre de moteurs liés n_b
- flux de moteurs non liés, J_u , dans le bout.

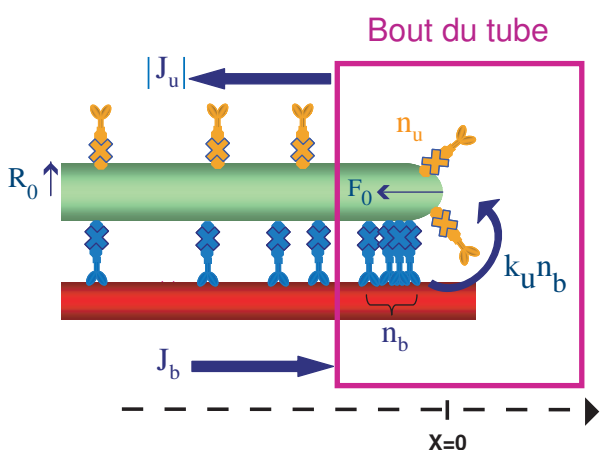


FIG. 3.14 – Les différents flux de moteurs qui interviennent dans la dynamique du bout du tube : le flux de moteurs liés (J_b), le flux de moteurs non liés (J_u), le flux de détachement de moteurs liés au niveau du bout : $k_u n_b$. n_b et n_u sont les nombres de moteurs liés et non liés au MT au niveau du bout du tube. La force statique nécessaire pour extraire un tube F_0 est représentée, ainsi que R_0 , le rayon du tube. Le système est représenté dans le référentiel du bout du tube. L'axe des x est centré sur le bout du tube.

Les variations de n_b et n_u sont alors données par les équations de conservation :

$$\frac{dn_b}{dt} = J_b(x=0, t) - k_u(n_b)n_b \quad (3.22)$$

$$\frac{dn_u}{dt} = J_u(x=0, t) + k_u(n_b)n_b \quad (3.23)$$

Notons ici que les événements d'accrochage de moteurs sur le MT (symétriques aux événements de détachement) ont été négligés au bout du tube. En effet, le temps nécessaire pour sortir du bout par diffusion est de l'ordre de R_0^2/D (R_0 étant le rayon du tube, de l'ordre de 20 nm dans des conditions typiques de tension et rigidité de courbure⁹), soit quelque 10^{-4} s. Il est beaucoup plus petit que le temps caractéristique d'accrochage des moteurs sur le MT¹⁰ : $1/k_b \simeq 0,2$ s. Les moteurs

⁹voir §A.3.1

¹⁰voir ch.3 §B.4.3 et ch.5 §C pour la détermination de k_b dans nos expériences

non liés sortent donc du bout du tube avant d'avoir eu le temps de s'attacher au MT. Ceci revient à dire que $J_u \gg k_b n_u$.

Comme nous l'avons vu au ch.2 §B.3.1, le taux de détachement d'une kinésine d'un MT, k_u , dépend de la force appliquée sur le moteur. Comme la force F_0/n_b est appliquée sur chaque moteur du bout, le taux de détachement dans cette région vaut donc, en utilisant l'équation 2.4 :

$$k_u(n_b) = k_u^0 \exp\left(\frac{F_0 a}{K_B T} \frac{1}{n_b}\right) \quad (3.24)$$

Les flux J_b et J_u sont exprimés dans le référentiel lié du tube (où $x=0$ correspond à la position du bout du tube). En général, la dynamique du système devrait être décrite dans le référentiel du laboratoire puisque la vitesse du tube V n'est pas nécessairement constante. Cependant, comme nous allons chercher des solutions avec n_b constant (voir §B.3.4), donc V constante, nous pouvons tout de même utiliser le référentiel du tube. Dans ces conditions, le flux de moteurs liés (allant à la vitesse V_0 dans le référentiel du laboratoire) entrant dans cette région est donc donné par :

$$J_b(x=0, t) = \rho_b(x=0, t)[V_0 - V] \quad (3.25)$$

puisque les effets de gêne stérique entre moteurs qui entraîneraient la présence d'un terme non linéaire en $(1-\rho_b/\rho_{max})$ dans J_b ont été négligés. On suppose donc que le système est dans un régime de basse densité de moteurs, en accord avec nos expériences faites sur le système. La formation de phases haute et basse densités est présentée plus précisément au paragraphe suivant. Ce qu'il faut retenir ici est que $\rho(x=0)$ couple la dynamique au bout du tube et le transport le long du tube.

B.3.2 Description des phases hautes densités et basses densités de kinésines le long d'un MT

✓ Cas de la géométrie cylindrique fermée

La description théorique des phases haute et basse densités de moteurs moléculaires le long d'un filament a été tout d'abord décrite dans le groupe de Lipowsky [Lipowsky et al., 2001]. Ils ont effectué des simulations de Monte Carlo pour décrire le mouvement stochastique des moteurs moléculaires le long d'un filament auquel ils peuvent s'associer dans différentes situations (soit confinés dans un volume fermé, soit dans un volume ouvert, de géométrie donnée). Aucun des cas étudiés ne correspond exactement à notre système et notre géométrie. Nous verrons plus loin une description théorique complète de la répartition des moteurs moléculaires dans notre géométrie.

La cas de la géométrie tubulaire fermée des deux côtés se rapproche le plus de notre géométrie, c'est donc celle-ci qui va être détaillée maintenant. Elle est représentée figure 3.15(A). Le système consiste en un tube contenant N moteurs moléculaires libres de diffuser à 3D dans le volume ou d'avancer le long du filament de l'extrémité "-" vers l'extrémité "+". Les moteurs en volume (détachés) peuvent s'attacher au filament et les moteurs liés au filament peuvent se détacher ou bien faire

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

un pas en avant. Ils avancent alors avec une certaine vitesse et sont aussi caractérisés par un coefficient de diffusion. Le tube est fermé des deux côtés donc aucun moteur ne peut entrer ou sortir du volume. Ces conditions sont différentes des nôtres : les moteurs sont confinés sur une surface tubulaire à 2D et ne peuvent diffuser dans le volume. La grosse différence vient du fait que la longueur de notre tube augmente et que l'entrée du tube est alimentée en moteurs par la vésicule.

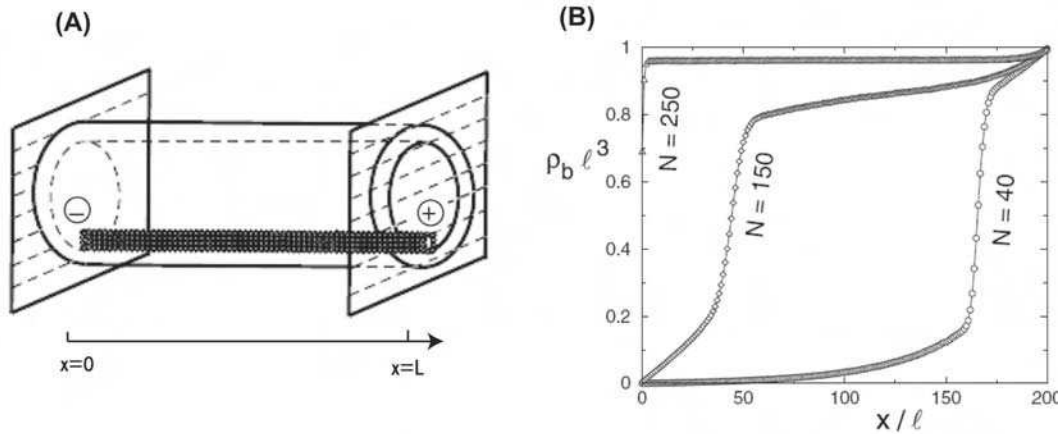


FIG. 3.15 – (A) Géométrie tubulaire fermée aux extrémités, contenant un filament orienté suivant l'axe x . Les moteurs sont libres de diffuser en solution, ou d'avancer le long du filament du "+" vers le "-". (B) Densité locale de moteurs liés par unité de monomère de filament l , en fonction de la distance x aussi normalisée par l . Les trois courbes représentent les trois résultats obtenus par simulations pour trois valeurs de N différentes. La longueur du tube est 200 et son diamètre : 25 l . D'après [Lipowsky et al., 2001].

Les auteurs ont ensuite effectué des simulations de Monte Carlo en utilisant des valeurs typiques pour les différentes probabilités de transition, les coefficients de diffusion et la vitesse du moteur et en faisant varier le nombre de moteurs présents N . Ils décrivent les phénomènes dans un régime stationnaire. Les résultats obtenus pour la densité de moteurs liés ρ_b suivant la direction x (le long du filament) normalisée par la densité maximale $1/l$ (où l est la taille d'un monomère de filament, $l=8$ nm pour un MT) sont représentés figure 3.15(B) pour trois valeurs de N différentes ($N=40$, 150 et 250). La longueur du tube est prise égale à 200 fois l , et son diamètre fait 25 fois l . Dans le cas où $N=40$ moteurs, on observe que sur presque toute la longueur du filament, la densité normalisée de moteurs liés est très petite devant 1, ce qui signifie que très peu de sites d'accrochage du filament sont occupés : c'est ce qu'on appelle la **phase basse densité**. Les moteurs liés ne se gênent pas et se comportent comme s'ils n'avaient pas de voisin. En revanche, au bout "+" du filament, on observe que la densité de moteurs liés tend vers 1. Dans cette région, il y a une **haute densité** de moteurs, ce qui signifie que les moteurs au bout ont une forte chance d'avoir un voisin devant et de ne pas pouvoir avancer plus loin. Les moteurs se gênent, et c'est exactement ce genre de

comportement que l'on a négligé dans la phase basse densité. La phase haute densité en bout de filament correspond à un embouteillage de moteurs (un "trafic jam"). Dans le cas où $N=150$, il est plus difficile d'observer la phase basse densité car la géométrie fermée empêche de l'observer. Dans le cas où $N=250$, le filament est pratiquement complètement recouvert de moteurs ; il n'y a qu'une phase de haute densité.

✓ *Coexistence de phase dans un transport à 1 dimension*

Le deuxième groupe à avoir travaillé sur les phases de haute et basse densités de moteurs le long de filaments est celui de Frey [Parmeggiani et al., 2003]. Le travail s'applique à l'ensemble des phénomènes de transport à 1 dimension, pas seulement celui des moteurs. L'étude présentée comporte à la fois la théorie, la résolution numérique des équations de transport (sans approximation de basse densité comme dans notre cas, et des simulations de Monte Carlo). Les particules sont décrites dans le cadre d'un mouvement totalement asymétrique avec un processus d'exclusion à 1 D (TASEP, Totally Asymmetric Exclusion Process) ; c'est-à-dire que les particules avancent le long d'un filament, dans une seule direction, et qu'elle ne peuvent avancer que si le site de devant est libre. Les auteurs ont en plus permis aux particules de s'attacher et de se détacher le long du filament avec des probabilité w_A et w_D (cinétique de Langmuir), et de rentrer et sortir aux extrémités avec des probabilités α et β (voir fig. 3.16(A)). Ils étudient la compétition entre le TASEP et la cinétique de Langmuir. Le filament est placé dans un réservoir de particules dont la concentration est supposée constante.

La différence avec notre géométrie vient d'abord de ce réservoir dont la concentration est constante, qui diffère de notre tube où les moteurs qui se détachent du MT augmentent la population de moteurs non liés et inversement. De plus, si on se place dans le référentiel du bout du tube, la probabilité de sortie de moteurs est nulle dans notre cas. Enfin, la longueur de tube croît.

Ils ont trouvé la limite en champ moyen de l'équation maîtresse qui décrit les phases de haute et basse densité. L'équation obtenue 3.26 (ci-dessous) peut être rapprochée de celle qui régit le transport des moteurs liés le long du tube dans notre cas, mais dans un cas plus général.

$$\frac{\varepsilon}{2}\partial_x^2\rho + (2\rho - 1)\partial_x\rho + \Omega_A(1 - \rho) - \Omega_D\rho = 0 \quad (3.26)$$

où $\varepsilon=L/N$ avec L , la longueur totale du filament, $\Omega_A = \omega_A N$ et $\Omega_D = \omega_D N$. Ω_A , Ω_D , α et β restent fixes quand N tend vers l'infini dans la limite thermodynamique. Les taux d'attachement/détachement (ω_A et ω_D) sont normalisés par la taille du système de façon à toujours avoir la compétition entre le TASEP et la cinétique de Langmuir. Dans le cas contraire, c'est la cinétique de Langmuir qui l'emporterait.

Les différents profils de particules qu'ils ont obtenu à la fois numériquement et par des simulations, pour différentes valeurs des probabilités se superposent bien. Le résultat le plus important est qu'il existe, dans un état stationnaire, des valeurs des paramètres impliqués tels qu'il y a coexistence entre une phase basse densité et une phase haute densité de particules sur le même filament. Un diagramme de phase en fonction de α et β est représenté figure 3.16(B). Ce diagramme de phase

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

qui tient compte de la cinétique de Langmuir modifie le diagramme dans le cas du mécanisme de TASEP uniquement, décrit auparavant dans [Kolomeisky et al., 1998] par exemple.

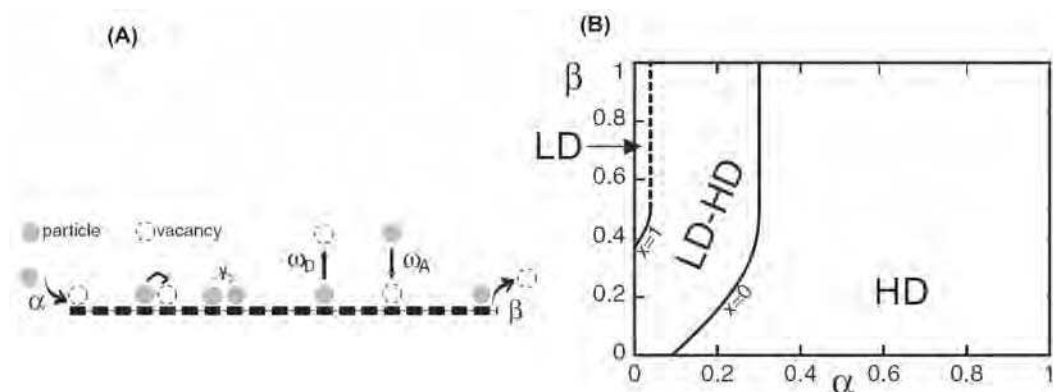


FIG. 3.16 – (A) Schéma du transport à 1D asymétrique avec processus d'exclusion le long d'un filament, avec en plus la possibilité de s'attacher et de se détacher du filament. (B) Diagramme de phases obtenu dans le cas de la résolution exacte de l'équation 3.26 en régime stationnaire dans le cas où $\omega_A/\omega_D = 3$ et $\Omega_D=0,1$ et N tend vers l'infini. LD : low density phase, HD : high density phase. D'après [Parmeggiani et al., 2003].

On peut enfin noter les travaux de Nédélec et al. qui ont étudié l'autoorganisation de MTs et de moteurs moléculaires, qui donne des profils de moteurs qui peuvent être décrits par la même physique que ce que l'on a décrit avant [Nedelec et al., 1997, Nedelec et al., 2001, Surrey et al., 2001].

B.3.3 Densité de moteurs liés

Pour étudier les conditions d'extraction d'un tube de membrane, il faut étudier ce qui se passe aux temps courts c'est-à-dire pour des temps inférieurs à $(k_u^0 + k_b)^{-1} \simeq 0,1$ s, durant les premières étapes de formation. On suppose qu'un tube a été tiré mais que sa longueur (Vt) est petite devant la longueur de diffusion (\sqrt{Dt}). On étudie alors dans quelle mesure le tube tiré existe et est stable. Pour cela, on a besoin de connaître l'expression du flux de moteurs liés entrant pour pouvoir résoudre les équations de la dynamique du bout du tube 3.22 et 3.23. D'après l'équation 3.25, il faut donc connaître l'expression de la densité de moteurs liés ρ_b en $x=0$. Pour les tubes très petits, comme la longueur du tube augmente mais que la densité de moteurs liés est fixée en $x=0$ (eq. 3.32) et en $x=-Vt$ (parce que le système n'a pas le temps d'évoluer du point de vue de l'attachement/détachement des moteurs par rapport à sa situation d'équilibre en $t=0$), on peut supposer que la densité de moteurs liés est uniforme le long du tube et égale à la densité initiale de moteurs liés ($\rho_b(x, t) = \rho_b^0$). On peut alors écrire l'équation de continuité de la densité totale de moteurs au niveau de la connexion avec la vésicule (fig. 3.17).

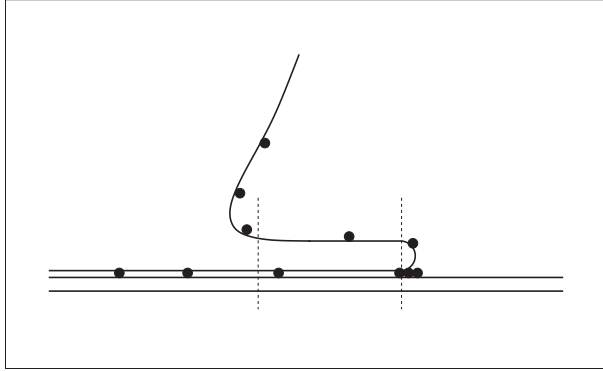


FIG. 3.17 – Représentation schématique d'un tube extrait d'une vésicule aux temps courts. On remarque qu'il n'y a alors pas d'angle entre le tube et la vésicule, contrairement à ce qui est représenté figure 3.12. Dessin de O.Campàs.

On a alors aux temps courts :

$$2\pi R_0 \rho_\infty = \rho_b^0 + \rho_u^0 \quad (3.27)$$

où ρ_b^0 et ρ_u^0 sont les densités initiales de moteurs au niveau de la vésicule. La continuité des densités de moteurs est vraie à tout instant mais il n'y a qu'aux temps courts que l'on peut écrire que la densité de moteurs liés est uniforme le long du tube et que l'on peut négliger les phénomènes de déplétion de moteurs au niveau de la vésicule. ρ_∞ est alors la densité surfacique initiale de moteurs sur la vésicule, c'est donc un paramètre connu et contrôlé, supposé uniforme sur toute la surface. De même, pour σ et κ donnés (ce qui est le cas de nos expériences), R_0 est connu aussi. Pour déterminer totalement ρ_b^0 , il faut pouvoir éliminer ρ_u^0 ; on utilise pour cela une deuxième équation qui exprime l'équilibre initial entre densité de moteurs liés et non liés :

$$k_u^0 \rho_b^0 = k_b \rho_u^0 \quad (3.28)$$

En combinant les équations 3.27 et 3.28, on obtient l'expression de ρ_b au niveau du bout aux temps courts :

$$\rho_b(x=0, t) = \rho_b^0 = 2\pi R_0 \frac{k_b}{k_u^0 + k_b} \rho_\infty \quad (3.29)$$

B.3.4 Critères de formation d'un tube de membrane

Il existe deux critères qui déterminent l'existence de tubes de membrane. Le premier critère porte sur la vitesse d'extraction du tube V qui doit être toujours positive. Nous vérifierons par la suite que ce critère n'est pas restrictif.

Pour décrire le second critère, on suppose tout d'abord que n_b et n_u sont constants. Ainsi, aux temps courts ($t < (k_u^0 + k_b)^{-1}$), les moteurs n'ont pas le temps de s'attacher ou se détacher. On regarde ensuite s'il est possible d'avoir des solutions stables pour le petit tube tiré. On a :

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

$$\frac{dn_b}{dt} = 0 \quad (3.30)$$

$$\frac{dn_u}{dt} = 0 \quad (3.31)$$

Ce qui justifie l'hypothèse que la vitesse des moteurs qui tirent et donc celle du tube est constante puisque n_b est constant (voir eq. 3.21). n_b constant lors de l'extraction du tube est aussi compatible avec une force constante ¹¹ F_0 . Ceci n'est possible que s'il y a équilibre des flux entrant et sortant de moteurs au niveau du bout. Ce qui signifie d'après les équations 3.22 et 3.23 que :

$$J_b(x=0) = k_u(n_b)n_b \quad (3.32)$$

$$J_b(x=0) = -J_u(x=0) \quad (3.33)$$

Le flux de détachement de moteurs équilibre exactement le flux entrant de moteurs liés au niveau du bout, le nombre de moteurs n_b reste donc bien constant. En utilisant les expressions de $k_u(n_b)$ et $\rho_b(x=0)$ qui interviennent dans J_b , déterminées aux paragraphes précédents (eq. 3.24 et 3.29), on a :

$$2\pi R_0 \frac{k_b}{k_u^0 + k_b} \rho_\infty [V_0 - V] = k_u^0 \exp\left(\frac{F_0 a}{K_B T} \frac{1}{n_b}\right) n_b \quad (3.34)$$

En utilisant l'expression de la vitesse de l'équation 3.21 qui donne : $V_0 - V = V_0 \frac{F_0}{F_S} \frac{1}{n_b}$, ainsi que les expressions de F_0 et R_0 en fonction de κ et σ (eq. 3.4), le critère pour avoir un tube correspond à l'existence de solutions n_b à l'équation suivante :

$$\boxed{g(n_b) = \Gamma^2} \quad (3.35)$$

avec

$$g(n_b) \equiv \exp\left(\frac{F_0 a}{K_B T} \frac{1}{n_b}\right) n_b^2 \quad (3.36)$$

$$\Gamma^2 \equiv 4\pi^2 \frac{k_b}{k_u^0 + k_b} \frac{V_0}{k_u^0} \frac{\kappa}{F_S} \rho_\infty \quad (3.37)$$

La fonction g est représentée en fonction de n_b (fig. 3.18) pour une valeur fixée de la tension de membrane σ et de la rigidité de courbure κ , qui correspondent aux valeurs utilisées dans nos expériences ($\sigma \simeq 2.10^{-4}$ N/m et $\kappa = 12 K_B T$). La valeur de la force F_0 est aussi fixée par ces choix. Sachant que tous les paramètres qui apparaissent dans l'expression de Γ^2 équation 3.37 sont connus (k_u^0 , k_b ¹², V_0 , κ) et fixés exceptée la densité surfacique de moteurs ρ_∞ , il est possible de trouver pour

¹¹on a négligé l'overshoot présenté au §A.3.2, mais on suppose ici que le tube existe déjà; F_0 est la force pour le maintenir

¹²voir la détermination de k_b §B.4.3

quelles valeurs de ρ_∞ il existe des solutions en n_b . On remarque qu'il existe un certain seuil en ρ_∞ (et donc en Γ) au-dessous duquel il n'y a aucune solution et au-dessus duquel il existe deux solutions pour n_b . Pour $\rho_\infty = \rho_\infty^S$, au seuil, il existe une unique solution. Les différentes possibilités pour ρ_∞ (et donc Γ), sont représentées figure 3.18 en pointillé. La valeur obtenue pour le nombre de moteurs qui tirent au seuil n_b^S dépend évidemment des valeurs prises pour σ et κ .

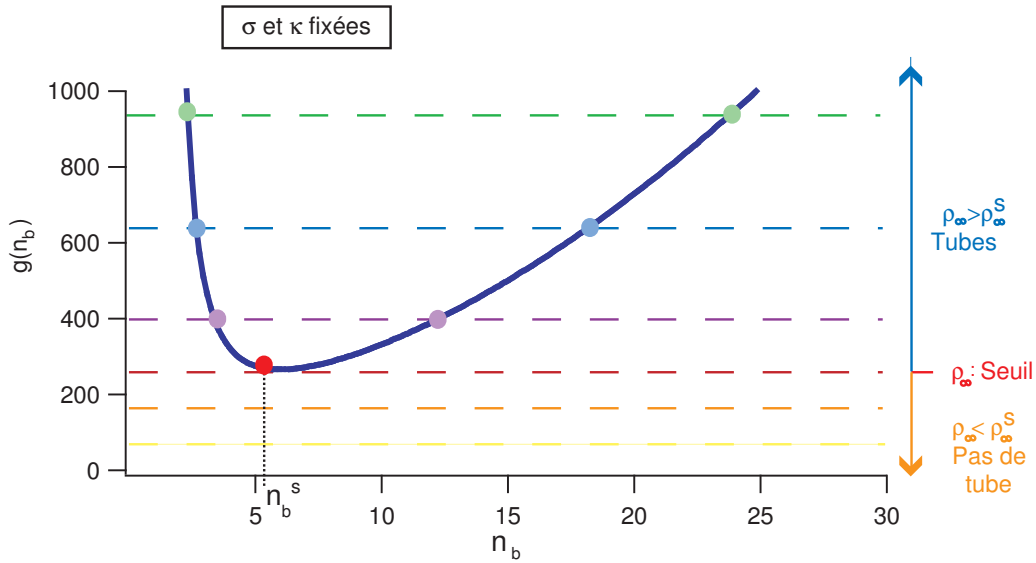


FIG. 3.18 – Fonction g définie dans l'équation 3.36 en fonction de n_b pour une valeur fixée de la tension de membrane σ et de la rigidité de courbure κ . Suivant la valeur de Γ , donnée par l'équation 3.37 et imposée par la densité surfacique de moteurs ρ_∞ choisie, il existe ou non des solutions en n_b . Pour $\rho_\infty > \rho_\infty^S$ il y a deux solutions, pour $\rho_\infty < \rho_\infty^S$ il n'y a pas de solutions, pour $\rho_\infty = \rho_\infty^S$ il y a une solution unique. n_b^S représente le nombre de moteurs qui tirent au seuil dans ces conditions.

On peut noter ici que la forme globale de la courbe représentée figure 3.18 avait été présentée dans [Koster et al., 2003]. Cependant, comme le bilan complet des flux de moteurs dans tout le système n'avait pas été fait, il n'était pas possible d'extraire des données quantitatives sur le seuil.

On peut finalement remarquer que le seuil (en Γ ou en ρ_∞) dépend de σ et κ puisque ces derniers fixent la position de la courbe fig. 3.18. Il n'est donc pas général. Nous allons voir maintenant qu'il est possible de décrire l'existence de ce seuil de formation de tube de façon plus générale en utilisant des variables adimensionnées.

B.3.5 Seuils d'existence de solutions

Pour décrire le système de façon adimensionnée, on utilise les variables sans dimension suivantes :

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

$$\nu \equiv \frac{a}{K_B T} \frac{F_0}{\Gamma} \quad (3.38)$$

$$x \equiv \frac{n_b}{\Gamma} \quad (3.39)$$

où Γ est défini dans par l'expression 3.37. L'équation 3.35 devient :

$$\exp\left(\frac{\nu}{x}\right) x^2 = 1 \quad (3.40)$$

Il est important de noter qu'il n'y a maintenant plus qu'un seul paramètre ν pour déterminer l'existence de solutions du système (éq. 3.40). Elles sont représentées figure 3.19. Toutes les courbes pour toutes les valeurs de tension et de rigidité de courbure possibles se superposent en une seule. On obtient un diagramme de bifurcation de type "saddle-node" où ν est le paramètre de bifurcation. Il existe ainsi une valeur seuil pour ν , $\nu_S = 2e^{-1} \simeq 0,74$, au-dessus de laquelle il n'y a pas de solution, donc pas de tube, et au-dessous de laquelle il y a deux solutions par valeur de ν . Ce seuil correspond bien sûr au seuil présenté au paragraphe précédent, mais il intègre en plus la dépendance en σ , (κ étant déjà présent dans l'expression de Γ^2).

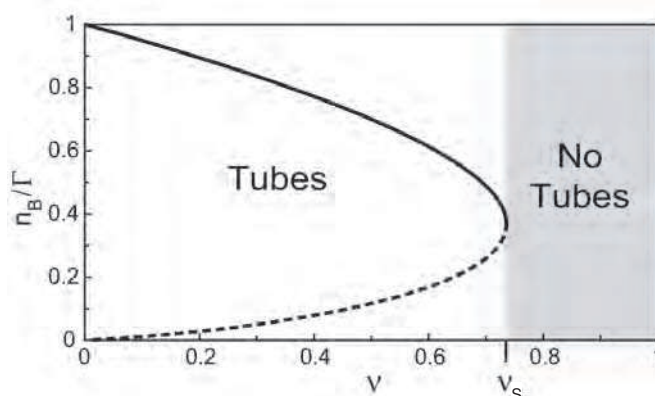


FIG. 3.19 – Solutions de l'équation 3.40 en fonction de ν . Ceci représente un diagramme de bifurcation (type "saddle-node") où ν est le paramètre de bifurcation. Les solutions stables sont représentées par une ligne continue, les solutions instables (voir §suivant) par des pointillés. On remarque que pour $\nu > \nu_S$, il n'y a pas de solution. D'après [Leduc et al., 2004].

Il est possible d'écrire l'expression du seuil $\nu_S = 2e^{-1}$ de deux façons différentes suivant le point de vue adopté, en utilisant les paramètres physiques du problème.

✓ Si on fixe la tension de membrane et que l'on augmente progressivement la densité surfacique de moteurs, on observe un seuil en densité déjà mentionné au paragraphe précédent. Le seuil en ρ_∞ a pour expression, en utilisant les expressions qui définissent ν (eq. 3.38) et Γ (eq. 3.37) :

$$\rho_\infty^S \equiv \frac{e^2}{2} \left(\frac{a}{K_B T} \right)^2 \frac{k_b + k_u^0}{k_b} \frac{k_u^0}{V_0} F_S \sigma \quad (3.41)$$

Il n'existe des solutions que si $\rho_\infty > \rho_\infty^S$. Cette expression de ρ_∞^S est générale puisqu'elle fait apparaître tous les paramètres du système, contrairement au seuil en Γ défini au paragraphe précédent qui dépendait des choix en σ et κ . Il existe donc une densité surfacique minimale de moteurs pour extraire un tube, ce qui était intuitivement prévisible : si le flux de moteurs entrant dans le tube depuis la vésicule (déterminé par ρ_∞ , voir l'équation de bord 3.27), n'est pas suffisant pour palier au flux de détachement de moteurs au bout du tube, alors le tube ne peut pas exister.

✓ Si maintenant c'est la densité surfacique de moteurs qui est fixée et que l'on augmente progressivement la tension de membrane, on remarque qu'il existe une tension maximale au-dessus de laquelle il n'est pas possible d'extraire de tube :

$$\sigma < \sigma_S \equiv 2e^{-2} \left(\frac{K_B T}{a} \right)^2 \frac{k_b}{k_b + k_u^0} \frac{V_0}{k_u^0} \frac{1}{F_S} \rho_\infty \quad (3.42)$$

Au-delà de cette tension, les moteurs présents à la surface ne sont plus assez nombreux pour fournir la force F_0 nécessaire pour extraire le tube. Le flux de détachement devient trop important par rapport au flux entrant de moteurs liés.

Ainsi, la tension de membrane et la densité surfacique de moteurs jouent le même rôle dans la dynamique de formation (ν varie comme $\sqrt{\sigma/\rho_\infty}$). Nous verrons au chapitre 5, lorsque la théorie sera confrontée aux expériences, qu'il est possible de vérifier de façon quantitative l'existence de ces seuils. Remarquons enfin que l'existence du seuil de formation de tube de membrane est complètement indépendante de la présence de l'overshoot dans la courbe force-longueur de tube présentée au §A.3.2 ; il n'est déterminé que par la dynamique du système.

B.3.6 Stabilité des solutions obtenues

Le critère d'existence d'un tube est déterminé par le critère d'existence de solutions pour n_b à l'équation 3.40. Au-dessous de la valeur seuil de ν , nous avons vu qu'il existe deux solutions. Pour savoir maintenant si ces solutions sont stables, il faut étudier ce qui se passe lorsque des petites fluctuations font varier la valeur du nombre de moteurs liés, au niveau des points fixes (quand $dx/dt=0$). Il faut pour cela reprendre l'équation qui donne l'évolution temporelle de n_b (eq. 3.22) et l'adimensionner, comme au paragraphe précédent. On a :

$$-x \frac{dx}{dt} = k_u^0 \left[\exp\left(\frac{\nu}{x}\right) x^2 - 1 \right] \quad (3.43)$$

La figure 3.20(A) représente l'évolution temporelle du nombre de moteurs liés au niveau du bout du tube adimensionné, x , donnée par xdx/dt (eq. 3.43) en fonction de x et de ν . Le plan donné par $-xdx/dt=0$ définit les points fixes du système et donc

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

les solutions que nous cherchons. Ce plan correspond au diagramme de bifurcation représenté figure 3.19.

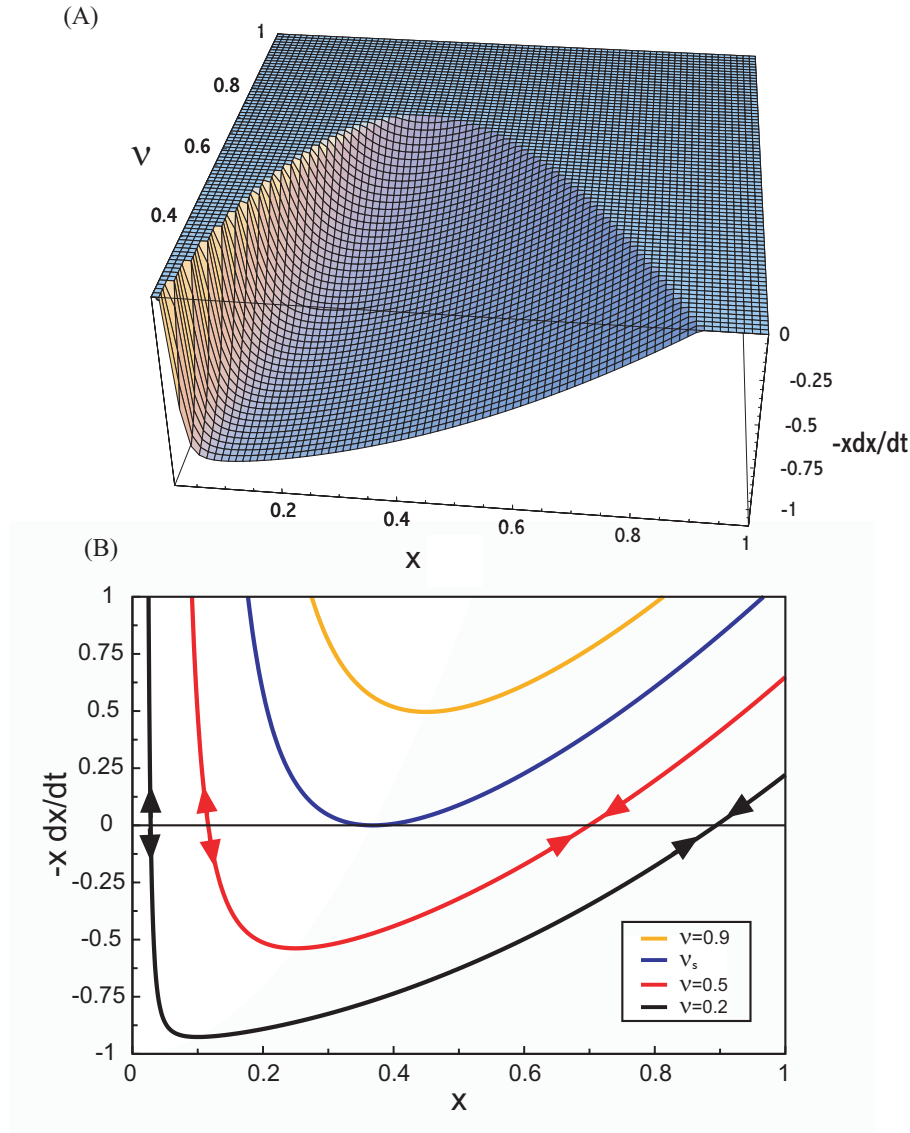


FIG. 3.20 – (A) Evolution temporelle du nombre adimensionné de moteurs liés au bout du tube, x , donnée ici par $-x dx/dt$, en fonction du paramètre de bifurcation ν et x . Les points fixes sont donnés par le plan $x dx/dt=0$. (B) Evolution temporelle du nombre adimensionné de moteurs liés au bout du tube, x , en fonction de x pour différentes valeurs du paramètre de bifurcation ν . Pour $\nu > \nu_s$, il n'y a pas de solution. Pour $\nu < \nu_s$, il existe deux solutions (deux points fixes), la première de petite valeur pour x est instable et la seconde est stable. Figure : O. Campàs.

Pour comprendre l'évolution temporelle des solutions autour du plan $x dx/dt=0$, on peut par exemple représenter sur un même figure $-x dx/dt$ en fonction de x pour différentes valeurs de ν ; ce qui représente la superposition de différents

Chapitre 3. Etude théorique de l'extraction et la croissance de tubes de membrane

plans $\nu = \text{constante}$ de la figure 3.20(A). La figure 3.20(B) représente cette superposition. On retrouve bien que pour des valeurs de ν supérieures au seuil, $\nu > \nu_S$, les courbes ne croisent jamais l'axe $y=0$; ce qui signifie qu'il n'y a pas de solutions (voir fig. 3.19) et pas de tube possible. Pour $\nu < \nu_S$, il y a bien deux solutions.

✓ *Stabilité de la solution à petit x .*

Imaginons qu'une petite fluctuation fasse diminuer la valeur de x près du point fixe. Alors, en se déplaçant sur la courbe représentée fig. 3.20(B) (pour $\nu < \nu_S$), on trouve que $-xdx/dt$ est positif, donc dx/dt est négatif puisque x est positif. Le nombre de moteurs adimensionné a donc tendance à diminuer encore plus. En d'autres termes, la perte d'un moteur entraîne la perte de plus de moteurs. La solution est donc instable.

✓ *Stabilité de la solution à grand x .*

Si on ajoute une petite fluctuation sur le point fixe x de plus grande valeur, qui tend à le faire augmenter, alors on a : $-xdx/dt > 0$ donc $dx/dt < 0$. Le nombre de moteurs adimensionné a tendance à diminuer et à retourner vers la valeur du point fixe. La quantité de moteurs perdus est restaurée. La solution est donc stable, comme cela avait été annoncé figure 3.19.

B.3.7 Nombre de moteurs qui tirent le tube

Nous avons vu sur la figure 3.19 que les solutions stables sont comprises entre $\nu = 0$ et $\nu = \nu_S$. Les valeurs correspondantes pour x appartiennent à l'intervalle : $1/e < x^{st} < 1$. Il est donc possible de donner un intervalle pour le nombre de moteurs n_b qui tirent le tube aux temps courts :

$$\frac{\Gamma}{e} < n_b < \Gamma \quad (3.44)$$

✓ Si la densité surfacique de moteurs ρ_∞ et la rigidité de courbure sont fixées, alors Γ est fixée indépendamment de la valeur de la tension de membrane que l'on fait varier. La tension maximale au seuil σ_S est alors telle que le Γ que l'on a fixé est égal au Γ_S (voir fig.3.18), mais nous n'avons pas besoin de la connaître, juste de savoir qu'elle existe. Il est donc possible d'obtenir l'encadrement du nombre de moteurs qui tirent n_b sans avoir besoin de connaître la tension. Il suffit juste de savoir qu'elle est inférieure à σ_S (tension maximale au seuil, quand $n_b = n_b^{min}$) et que quand σ diminue, n_b augmente jusqu'à atteindre sa valeur maximale Γ . C'est une remarque importante parce qu'on verra plus loin qu'il est très difficile d'un point de vue expérimental de travailler dans des conditions de tension contrôlée.

✓ Si maintenant la tension de membrane est fixée, il faut alors augmenter la densité surfacique de moteurs ρ_∞ pour faire varier n_b de sa valeur minimale n_b^S à sa valeur maximale. Dans ce cas, la valeur de Γ dans la borne inférieure eq. 3.44 (définie par la valeur de ρ_∞^S au seuil) n'est pas la même que celle dans la borne supérieure.

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

Pour connaître le nombre exact de moteurs qui tirent le tube, lorsque l'on connaît la tension de membrane, il faut commencer par calculer les valeurs de Γ et ν correspondantes, puis résoudre l'équation implicite 3.40 pour trouver la valeur de x . Il faut bien entendu choisir la plus grande valeur de x (lorsqu'il y a deux solutions) pour choisir la solution stable. Ensuite, l'équation 3.39 permet de trouver la valeur de n_b correspondante.

Un exemple concret de calcul du nombre de moteurs qui tirent sera présenté au chapitre 5. On peut cependant remarquer sur la figure 3.18 qui a été tracée avec des valeurs réalistes de σ , κ et différentes valeurs de ρ_∞ , que pour $\rho_\infty = \rho_\infty^S$, le nombre de moteurs qui tirent au seuil est de l'ordre de 5. Bien sûr, ce nombre est très petit ce qui signifie que l'étude des fluctuations apportera beaucoup à la description du système.

En ce qui concerne **le nombre de moteurs qui tirent au seuil** de formation d'un tube, n_b^S , il est possible d'obtenir une expression simple en écrivant que n_b^S minimise la fonction g (eq. 3.36). On a alors :

$$n_b^S = \frac{F_0 a}{2K_B T} \quad (3.45)$$

n_b^S dépend de σ et κ , par l'intermédiaire de la force.

Pour finir, il est intéressant de comparer le nombre de moteurs obtenus au seuil ($F_0 a / 2K_B T$) avec celui qu'on aurait obtenu en divisant simplement la force nécessaire pour extraire un tube F_0 par la force maximum que peut exercer une kinésine F_S . Par exemple, dans les conditions précédentes, on a obtenu $n_b^S = 5$ moteurs ; si on calcule la force correspondant aux valeurs de σ et κ fixées, elle est de l'ordre de 27 pN et la simple division F_0 / F_S donne aussi 5 moteurs. Cette coïncidence liée aux propriétés intrinsèques de la kinésine utilisée ($F_S \simeq 6,3$ pN, $a \simeq 1,3$ nm) ne doit pas faire oublier que c'est bien la dynamique du système (flux entrant de moteurs au bout contrebalancé par le flux de détachement au niveau du bout) qui fixe le nombre de moteurs qui tirent.

B.4 Dynamique de croissance d'un tube de membrane, étude aux temps longs

Nous allons maintenant étudier la croissance d'un tube de membrane. Nous nous plaçons donc dans une région de l'espace des phases compatible avec l'existence de ce tube. L'étude est faite aux temps longs, c'est-à-dire que le tube a eu le temps de pousser et de créer une zone de connexion avec la vésicule non accrochée au MT (voir zone II fig. 3.12). Nous allons alors décrire complètement ces densités de moteurs le long du tube en faisant un bilan de flux de moteurs pour déterminer les équations dynamiques du système et en écrivant les conditions de bord entre les différentes zones (fig. 3.12). Le but est de pouvoir comparer ensuite au chapitre 5 les densités de moteurs obtenues (ou plutôt leur somme puisqu'on ne peut pas distinguer expérimentalement les moteurs liés et moteurs non liés) avec celles obtenues

Chapitre 3. Etude théorique de l'extraction et la croissance de tubes de membrane

expérimentalement et en déduire des informations sur la dynamique d'accumulation des moteurs au bout du tube (présentée au §B.2.2).

B.4.1 Bilan de flux de moteurs le long du tube

Pour déterminer les équations dynamiques couplées qui régissent l'évolution de ρ_b et ρ_u (densités linéiques de moteurs liés et non liés le long du tube de direction x , $x=0$ correspondant au bout du tube), il suffit d'effectuer un bilan de flux sur une petite longueur δx du tube pendant un temps très court δt :

$$\begin{aligned}\frac{\partial \rho_b(x, t)}{\partial t} + \frac{\partial J_b(x, t)}{\partial x} &= -k_u^0 \rho_b(x, t) + k_b \rho_u(x, t) \\ \frac{\partial \rho_u(x, t)}{\partial t} + \frac{\partial J_u(x, t)}{\partial x} &= k_u^0 \rho_b(x, t) - k_b \rho_u(x, t)\end{aligned}\quad (3.46)$$

Ces équations font intervenir les flux de moteurs liés J_b et non liés J_u le long du tube, ainsi que les flux d'attachement et de détachement de moteurs au MT faisant intervenir les taux k_u^0 et k_b . Nous avons vu au paragraphe B.2.2 que les moteurs liés au MT le long du tube ne subissent aucune force appliquée par la membrane, leur taux de détachement est donc bien k_u^0 (eq. 2.4).

Pour résoudre ce système, on va supposer dans la suite qu'il existe un état quasi-stationnaire, et que la vitesse du tube est à peu près constante. Nous discuterons à la fin cette hypothèse. Si V est constante, il est alors possible de résoudre les équations dans le référentiel lié au tube. Dans ce cas, les expressions des flux de moteurs sont :

$$J_b(x, t) = (V_0 - V)\rho_b(x, t) \quad (3.47)$$

$$J_u(x, t) = -D \frac{\partial \rho_u(x, t)}{\partial x} \quad (3.48)$$

En effet, le transport par diffusion des moteurs liés est négligeable devant le transport par convection. Le transport des moteurs non liés est effectué en revanche juste par diffusion avec le coefficient de diffusion des moteurs à la surface de la membrane introduit précédemment D .

B.4.2 Expression des densité de moteurs le long du tube

Il est intéressant à ce point de la démonstration de faire le bilan des inconnues et des équations dont nous disposons pour montrer que le système peut avoir des solutions. La première équation 3.46 est une équation différentielle d'ordre 1, elle fait donc introduire une constante d'intégration. Cependant, comme la vitesse V (ou n_b) n'est pas connue, il faut en fait 2 constantes. La seconde équation est une équation différentielle d'ordre 2, elle fait donc apparaître 2 constantes d'intégration. Pour résoudre le système, nous avons donc besoin de 4 conditions limites pour déterminer les constantes.

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

✓ *Forme des solutions recherchées*

Nous cherchons les solutions des équations 3.46. Pour cela, nous faisons l'hypothèse que les densités dans l'espace de Laplace sont de la forme :

$$\begin{aligned}\rho_b(x, s) &= \frac{\rho_b^\infty}{s} + B(s) \exp(qx) \\ \rho_u(x, s) &= \frac{\rho_u^\infty}{s} + U(s) \exp(qx)\end{aligned}\tag{3.49}$$

où ρ_b^∞ et ρ_u^∞ sont les densités de moteurs au milieu du tube, dans la zone loin des bords où ces densités peuvent être considérées comme constantes. S'il est possible de trouver des solutions en ρ_b et ρ_u de cette forme compatibles avec les conditions de bord, alors le problème sera résolu puisque les solutions des équations 3.46 sont uniques. Bien entendu, les différentes constantes qui apparaissent dans les expressions de ρ_b et ρ_u ne sont pas indépendantes puisqu'elles sont couplées par les équations 3.46 exprimées dans l'espace de Laplace.

✓ *Equation caractéristique*

L'hypothèse sur la forme des solutions (eq. 3.49) permet, à partir des équations 3.46 exprimées dans l'espace de Laplace d'obtenir une équation caractéristique en q dans la limite des temps longs ($s \rightarrow 0$) :

$$\frac{V_0 - V}{k_u^0} q^2 + q - \frac{V_0 - V}{k_u^0} \frac{k_b}{D} = 0\tag{3.50}$$

Cette équation a deux solutions en q , une positive et une négative. Seule la solution positive q est physiquement acceptable et a été retenue dans les expressions 3.49. C'est la première des quatre contraintes qui va permettre de déterminer complètement les densités de moteurs.

✓ *Contraintes permettant de résoudre le système*

1/ La première contrainte vient du fait qu'aucun terme en $\exp(-q'x)$ n'apparaît dans l'expression des solutions (eq. 3.49), $(-q') < 0$ étant la solution négative de l'équation caractéristique 3.50. En effet, ces termes divergeraient lorsque x tend vers $-\infty$ (loin du bout en $x=0$, vers les x négatifs fig. 3.13), ils ne sont donc pas physiquement acceptables.

2/ La deuxième contrainte est donnée par l'expression de ρ_u^∞ qui est entièrement déterminée par les relations de continuité de flux et de densités au niveau de la vésicule (connexion I-II fig. 3.12) et au niveau de la zone de connexion avec le tube (II-III fig. 3.12). Il est ensuite possible de déduire ρ_b^∞ en utilisant l'équation :

$$k_u^0 \rho_b^\infty = k_b \rho_u^\infty\tag{3.51}$$

issue des équations 3.46. Cette équation montre qu'il n'y a pas d'accumulation de moteurs le long du tube loin des bords et illustre le couplage entre les constantes

mentionné plus haut.

3/ Les deux dernières conditions pour déterminer les densités sont données par :

$$\begin{aligned}\frac{dn_b}{dt} &\simeq 0 \\ \frac{dn_u}{dt} &\simeq 0\end{aligned}\quad (3.52)$$

Contrairement à la partie précédente, ces égalités ne sont plus strictes mais approchées. Elles supposent que les nombres de moteurs n_b et n_u varient très lentement avec le temps, ce qui justifie que la vitesse du tube soit considérée comme constante. Il y a conservation du flux total ($d(n_b + n_u)/dt = 0$). Enfin, elles permettent de relier le flux entrant de moteurs liés au bout du tube, $(V_0 - V)\rho_b(x = 0, t)$, au flux de détachement $k_u(n_b)n_b$ et de remonter aux expressions de B(s) et U(s).

✓ *Expressions des densités de moteurs le long du tube*

L'équation caractéristique 3.50 n'a qu'une seule solution positive q qui va déterminer la longueur caractéristique de croissance des densités de moteurs au bout du tube. Cette longueur caractéristique a pour expression :

$$\lambda = 2 \frac{V_0 - V}{k_u^0} \frac{1}{\sqrt{1 + 4 \frac{k_b^0}{k_u^0} \frac{(V_0 - V)^2}{k_u^0 D} - 1}} \quad (3.53)$$

Il n'est pas nécessaire de détailler plus les calculs qui permettent d'obtenir les expressions exactes de ρ_b et ρ_u puisque seule la dépendance exponentielle en λ a une importance dans la suite. Il était à mon sens simplement important de montrer que nous avons tous les outils pour les mener à terme. Finalement, nous venons de montrer que les densités de moteurs le long du tube sont données par des expressions dans l'espace réel du type :

$$\begin{aligned}\rho_b(x, t) &= \rho_b^\infty \left(1 + B(t) \exp\left(\frac{x}{\lambda}\right)\right) \\ \rho_u(x, t) &= \rho_u^\infty \left(1 + U(t) \exp\left(\frac{x}{\lambda}\right)\right)\end{aligned}\quad (3.54)$$

où la dépendance avec le temps de B(t) et U(t) est très lente. Cependant, cette croissance dans le temps ne peut pourtant pas durer indéfiniment puisque la densité de moteurs au bout du tube va finir par saturer. Ceci est dû au nombre limité de sites d'accrochage de moteurs sur la membrane. Le nombre de moteurs liés au bout du tube, n_b , dont l'expression permet de déterminer B(t) et U(t), sature donc aussi au bout d'un certain temps. Il se forme un embouteillage de moteurs ("traffic jam", voir [Lipowsky et al., 2001], et §B.3.2) dont la taille ne dépend pas du temps et est régie par la cinétique de Langmuir [Parmeggiani et al., 2003]. Même pour ces temps très longs, la croissance exponentielle en λ des densités de moteurs ρ_b et ρ_u reste vraie.

B. Dynamique de formation et de croissance d'un tube de membrane tiré par des kinésines

La figure 3.21 montre un exemple de profil de densité (somme des moteurs liés et non liés ¹³) calculé par O. Campàs pour un instant donné dans le domaine des temps longs, avec des paramètres raisonnables pour les constantes physiques qui apparaissent dans les expressions de λ , ρ_b^∞ etc. On observe bien la croissance exponentielle de la densité de moteurs vers le bout du tube, mais la présence du "traffic jam" au bout du tube n'est pas représentée.

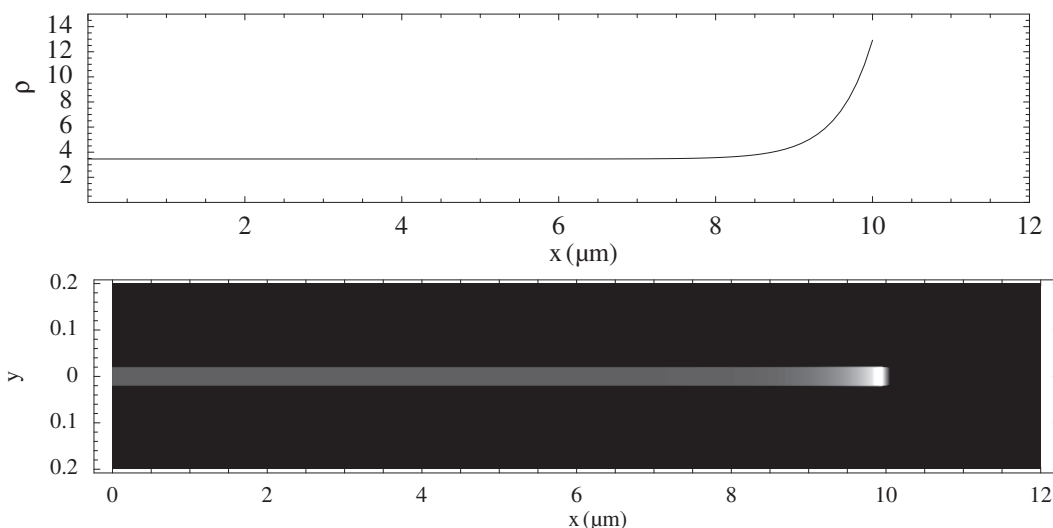


FIG. 3.21 – Exemple de profil calculé pour la somme des densités de moteurs liés et non-liés le long d'un tube de membrane aux temps longs. On remarque l'accumulation exponentielle de la densité de moteurs vers le bout du tube. Figure : O. Campàs.

B.4.3 Détermination du taux d'attachement des kinésines sur un MT

Il est intéressant de noter dans l'étude précédente que les deux densités de moteurs liés et non liés font intervenir la même longueur caractéristique λ de croissance au bout du tube. Leur somme fait donc aussi apparaître cette longueur. Sachant qu'il est possible d'observer expérimentalement la somme des densités de moteurs liés et non liés (voir ch.4), il est possible d'observer cette longueur λ si elle est d'une taille accessible en microscopie optique. Nous verrons par la suite qu'il est en effet possible d'observer λ et de l'analyser de façon quantitative : comme l'expression 3.53 ne fait apparaître que des propriétés connues de la kinésine (k_u^0 , V_0 , D) excepté k_b , ainsi que la vitesse du tube que l'on peut mesurer, il est donc possible à partir d'une étude statistique de λ en fonction de V de remonter à k_b , le taux d'attachement d'une kinésine sur un MT dans notre géométrie tubulaire. La confrontation de la théorie avec les expériences nous permettra d'énoncer les limites de la théorie et quelles sont les perspectives que nous avons pour l'améliorer.

¹³ce qui est observé dans mes expériences réalisées en microscopie de fluorescence lorsque les sites d'accrochage des moteurs sont marqués

Chapitre 3. Etude théorique de l'extraction et la croissance de tubes de membrane

Chapitre 4

Comment contrôler les paramètres physiques et biochimiques pertinents dans le système minimal *in vitro*

Les expériences d'Aurélien Roux et al. [Roux et al., 2002] et celles du groupe de Marileen Dogterom [Koster et al., 2003], présentées à la fin du chapitre 1, ont montré qu'il était possible de tirer des tubes de membrane à partir de GUVs (vésicules géantes unilamellaires) en utilisant uniquement des kinésines purifiées et fixées à la membrane, des MTs stabilisés et de l'ATP. Ces expériences avaient permis de faire la "preuve du concept", mais la plupart des paramètres physiques importants n'étaient pas contrôlés, ce qui ne permettait qu'une comparaison qualitative avec l'analyse théorique (ch.3). De plus, l'existence d'une accumulation dynamique de moteurs au bout des tubes n'avait pas été prouvée. L'étape suivante consistait donc à caractériser de façon quantitative les différentes étapes de formation, de croissance et d'arrêt des tubes. Pour cela, j'ai dû mettre au point un protocole expérimental qui permette de contrôler ou de connaître tous les paramètres importants qui peuvent influencer la dynamique du système, à savoir :

- la tension de membrane de la GUV (σ)
- la rigidité de courbure de la GUV (κ)
- la concentration de kinésines à la surface de la GUV (ρ_∞)
- le coefficient de diffusion de ces moteurs à la surface de la GUV (D)
- les paramètres physiques et biochimiques caractéristiques de la kinésine : son taux de détachement du MT, k_u , qui dépend de la force appliquée F_0 , la longueur a qui caractérise la variation de k_u avec F_0 , sa vitesse en fonction de la force appliquée (et donc sa force d'arrêt, F_S , et sa vitesse, V , en l'absence de force appliquée, V_0). Seul son taux d'attachement k_b n'est pas connu.

La chapitre 2 a permis de décrire en détail ces différents paramètres. La force statique nécessaire pour extraire puis maintenir le tube F_0 est décrite au chapitre 3. Nous avons vu qu'elle est constante une fois que le tube est tiré (si le tube n'est pas trop long) et qu'elle dépend de σ et κ . Nous avons aussi vu l'importance des

paramètres σ et ρ_∞ , puisqu'ils permettent de déterminer le diagramme de phases qui donne les domaines d'existence de tubes. Leur connaissance est donc capitale pour décrire les étapes de formation d'un tube, et voir dans quelle mesure les observations expérimentales sont reliées à l'analyse théorique. Nous verrons donc, dans une première partie, la préparation des différents constituants du système minimal. Dans la seconde partie, la façon dont ces différents paramètres sont mesurés sera exposée, et nous insisterons sur la façon dont σ et ρ_∞ sont contrôlés. Dans une dernière partie, nous verrons le protocole exact de formation des tubes de membrane, avec les différentes expériences de contrôle réalisées, ainsi qu'une brève comparaison avec les protocoles déjà existants. Les résultats obtenus, leur analyse et leur comparaison avec la théorie seront présentés au chapitre 5.

A Préparation des différents composants

A.1 Rappel sur le système expérimental

Le système comprend des kinésines, des MTs et des GUVs. L'idée est d'accrocher les kinésines sur la membrane de la vésicule par une liaison suffisamment forte. Nous avons donc décidé d'utiliser la **liaison streptavidine/biotine**, qui est la plus forte liaison non covalente connue (la constante d'association est de 10^{-13} M^{-1}) en solution. La streptavidine (fig. 4.1(B)) est une protéine tetramérique qui peut en principe fixer quatre biotines. La biotine est une petite molécule (la vitamine H, fig. 4.1(A)) qui vient s'insérer dans la streptavidine par un mécanisme de type "clé-serrure".

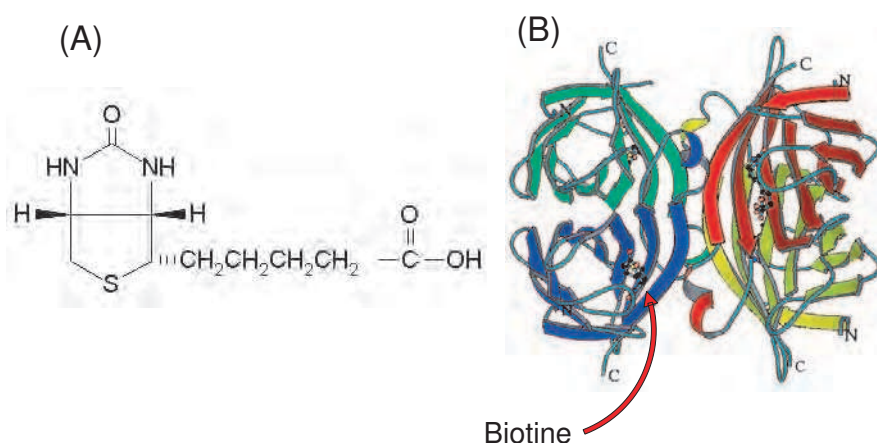


FIG. 4.1 – (A) Structure de la biotine. (B) Structure de la streptavidine qui a complexé 4 biotines. Une des biotines est repérée par une flèche. (Site internet : [//faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html](http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html)).

Pour réaliser cette liaison, nous avons utilisé des kinésines biotinyllées, attachées par l'intermédiaire d'une streptavidine à des lipides biotinyllés présents dans la membrane de la vésicule. Le système minimal utilisé est représenté fig. 4.2. La première

partie de mon travail de thèse a consisté à mettre au point un protocole de façon à avoir exactement **un lipide biotinylé pour une kinésine**, en utilisant une streptavidine.

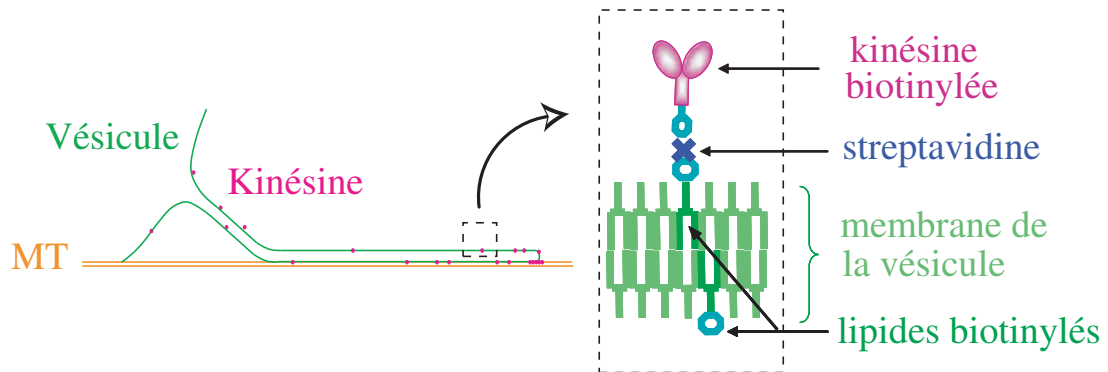


FIG. 4.2 – Schéma du système minimal d'extraction d'un tube de membrane (vert) par des kinésines (violette), qui avancent le long d'un MT (rouge). L'encadré correspond à un zoom sur la liaison kinésine-membrane : la kinésine biotinylée est liée à la membrane de la vésicule contenant des lipides biotinylés par l'intermédiaire d'une streptavidine.

A.2 Les kinésines

A.2.1 Description du moteur utilisé

La kinésine que nous avons utilisée n'est pas exactement la kinésine conventionnelle décrite au ch.2 §B.1.2. La construction utilisée a été mise au point dans le groupe de J. Gelles à partir de la kinésine conventionnelle de *Drosophila Melanogaster* dans les années 90 [Berliner et al., 1994, Young et al., 1995]. C'est une kinésine qui a été génétiquement modifiée de façon à ne conserver essentiellement que les domaines moteurs (qui contiennent les sites de fixation aux nucléotides et au MT), les cous et une longueur suffisante de chaînes pour permettre la dimérisation (voir figure 2.5 pour la construction entière). La kinésine est dite tronquée (environ 50 kDa, 401 acides aminés). Comme elle ne possède plus de queue, son activité n'est plus régulée par association de la tête avec la queue (voir ch.1 §A.5.1 et la figure correspondante 1.16). De plus, la queue a été fusionnée avec le polypeptide BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein, un peu moins de 17 kDa) qui se lie de façon covalente avec la biotine sur la Lysine (K) 122 grâce à une enzyme présente dans les bactéries utilisées pour l'expression de la kinésine (*Escherichia Coli*). La kinésine de J. Gelles porte donc une biotine au niveau de la queue et elle est constamment capable d'avancer le long d'un MT, même en l'absence de cargo.

La construction de J. Gelles a ensuite été un peu modifiée par F. Nédélec et T. Surrey (EMBL, Heidelberg). Ils ont ajouté un triple "tag" Hemagglutine (appelé HA, une vingtaine d'acides aminés) qui permet d'attacher la kinésine à un anticorps

[Surrey et al., 1998]. Malheureusement, la présence de l'anticorps bloque le mouvement de la kinésine le long du MT ; il n'est donc pas possible d'utiliser un anticorps anti-HA fluorescent pour déterminer de façon dynamique la position des kinésines en microscopie de fluorescence.

A.2.2 Description du plasmide codant pour la kinésine

La construction génétique qui code pour l'expression de la kinésine tronquée décrite précédemment (Kin-Bio401-HA) a été insérée dans un plasmide¹ permettant son expression dans des bactéries *Escherichia Coli*. La souche utilisée est la souche BL21 génétiquement modifiée pour exprimer l'ARN polymérase du phage T7 (virus des bactéries). Le plasmide comprend (fig. 4.3) :

- un gène codant pour la kinésine, transcrit par l'ARN polymérase T7
- un promoteur T7, placé en amont du gène codant pour la kinésine. Il sert à lier spécifiquement l'ARN polymérase T7.
- un opérateur *LacO* de l'opéron lactose, situé entre le promoteur et le gène codant pour la kinésine. Il bloque la transcription du gène de la kinésine en l'absence de lactose à cause de la présence d'une protéine inhibitrice.
- un gène de régulation *LacI*, qui code pour la protéine inhibitrice de la transcription qui va se fixer sur l'opérateur *LacO*.
- un gène de résistance à un antibiotique particulier (ici, l'ampicilline). Ainsi, si les bactéries se multiplient dans un milieu contenant de l'ampicilline, seules les bactéries ayant inséré le plasmide pendant le transfert survivront.

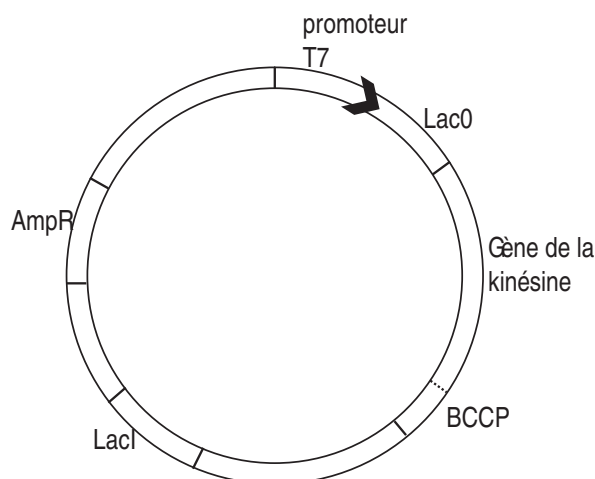


FIG. 4.3 – Représentation schématique du plasmide codant pour la kinésine. *LacI* code pour la protéine qui inhibe la transcription de kinésine en l'absence de lactose, en se fixant sur *LacO*. *AmpR* est le gène de résistance à l'ampicilline. Le promoteur T7 permet de fixer l'ARN polymérase T7.

L'intérêt majeur de ce genre de construction est qu'il est possible de découpler la phase de multiplication des bactéries de la phase d'une expression de la kinésine. En effet, l'expression ne commencera qu'en présence de lactose, ou plutôt d'IPTG (Iso-Propyl-Thio-Galactoside) qui est un inducteur plus puissant que le lactose car non dégradé par la bactérie. L'IPTG se fixe sur la protéine inhibitrice et l'empêche de s'associer sur l'opérateur *LacO*.

¹molécule d'ADN bicaténaire, circulaire et cytoplasmique, de petite taille et se répliquant de façon autonome

A.2.3 Principe de la purification de la kinésine biotinylée

Le principe de la purification de la kinésine biotinylée a été publié par le groupe de J. Gelles dans [Young et al., 1995]. L'injection d'IPTG se fait à faible concentration (0,1 mM) et faible température (27°C), ce qui permet une faible expression de la kinésine dans les bactéries. En effet, la kinésine est mal acceptée par les bactéries, et une surexpression tue les bactéries ou les force à agglomérer la kinésine en amas semi-cristallins, la rendant non fonctionnelle. L'injection d'IPTG est accompagnée d'une injection de biotine qui sera fixée par le BCCP porté par la queue de la kinésine. Un large excès de biotine est présent (x1000), mais la quantité de kinésines au final qui portent effectivement une biotine est de l'ordre de 60 à 80 %.

Le détail du protocole se trouve (en anglais) en annexe C, mais le principe est le suivant : les bactéries qui ont exprimé la kinésine sont lysées². Le lysat, qui contient toutes les protéines exprimées par les bactéries (pas seulement la kinésine) est ensuite passé successivement dans trois colonnes pour ne récupérer finalement que la kinésine :

- **une colonne de dessalage.** Cette colonne permet d'échanger la solution saline dans laquelle baignent les protéines. Les grosses protéines sont retenues dans la colonne et les sels sont éliminés, puis remplacés par une autre solution plus adaptée à la deuxième colonne.
- **une colonne d'affinité.** Cette colonne lie de façon spécifique les protéines contenant de la biotine. Elle contient des petites billes recouvertes d'avidine. Comme la liaison avidine-biotine est plus réversible que la liaison streptavidine-biotine, il est possible de décrocher les protéines biotinylées accrochées aux billes en éluant avec un large excès de solution de biotine concentrée (5 mM). Il est ainsi possible, avant de décrocher la kinésine biotinylée, de rincer et d'éliminer toutes les autres protéines présentes en solution.
- **une colonne échangeuse d'ions.** Cette colonne permet de concentrer la kinésine issue de la colonne 2. En effet, comme il faut un large excès de biotine pour décrocher la kinésine, celle-ci est très diluée. Elle se fixe dans la colonne 3 (par interaction électrostatique) en sortie de la colonne 2 et il est possible de la décrocher en injectant un gradient de solution saline. Au-delà d'une certaine concentration en sels, l'interaction kinésine/colonne n'est plus suffisante et la protéine passe en solution dans un volume beaucoup plus petit que le volume issu de la colonne 2 (environ 10 fois plus petit).

L'étape limitante dans cette purification est probablement l'utilisation de la colonne 2, qui fixe peu de protéines et en libère encore moins. Il est possible par cette méthode d'obtenir environ 200 μ g de protéines dans un volume de 0,5 à 1 mL de tampon à partir de 2 litres de culture bactérienne, ce qui constitue un stock pour 3 mois d'expériences environ. La kinésine est aliquotée et conservée dans un container rempli d'azote liquide. La figure 4.4 montre un gel effectué à la fin de chaque purification pour vérifier la présence et la pureté de la protéine isolée. La masse

²la membrane est cassée par l'action d'enzymes et d'ultra-sons. Tous les fragments cellulaires sont ensuite retirés par centrifugation.

Chapitre 4. Comment contrôler les paramètres physiques et biochimiques pertinents dans le système minimal *in vitro*

moléculaire de la protéine est déterminée de façon approximative grâce à un marqueur coloré dont chaque bande correspond à une masse molaire connue : plus les protéines sont lourdes et plus elles migrent loin lorsqu'un champ électrique est appliqué. On retrouve une masse molaire moléculaire de l'ordre de 60 kDa pour la kinésine.

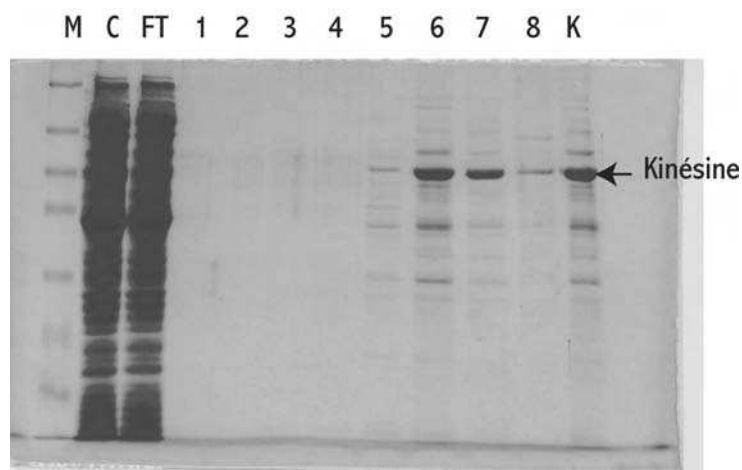


FIG. 4.4 – Gel montrant le contenu de différentes fractions de solutions de protéines : C (crude) et FT (Flow Throw) sont issues de solutions à la sortie de la colonne 1 et dans le surnageant de la colonne 2 respectivement. Toutes les protéines exprimées par les bactéries sont présentes puisque l'étape de sélection spécifique de la kinésine n'a pas encore été faite (grâce à la colonne 2). Les fractions numérotées sont issues de la sortie de la dernière colonne de purification. Les fractions 6 et 7 sont les plus concentrées et celles qui ont ensuite été dialysées avant d'être stockées dans l'azote liquide. La colonne K montre la kinésine après dialyse. La colonne la plus à gauche montre le marqueur de masse molaire moléculaire (appelé M).

La concentration de la solution de kinésine purifiée est mesurée par un bradford : c'est une solution qui devient bleue en présence de protéines. Il suffit de faire une gamme d'intensités de bleu avec des concentrations croissantes et bien déterminées en protéines (on utilise pour cela de l'albumine (BSA)) pour calibrer, puis de comparer le bleu obtenu avec la solution de kinésine à ceux obtenus par la gamme. Cette comparaison est effectuée en mesurant la transmission en spectroscopie visible. Typiquement, la kinésine purifiée à une concentration de l'ordre de 0,1 mg/mL, soit environ 1,5 μ M.

A.3 Les microtubules

A.3.1 Purification de la tubuline

Contrairement à la purification de la kinésine, que j'ai réalisée plusieurs dizaines de fois pendant ma thèse, je n'ai pas eu l'occasion de purifier de la tubuline, protéine constituant les MTs. Cette purification consiste à extraire la tubuline présente dans

des cerveaux de porcs. Cette purification est beaucoup plus efficace et productive qu'une production obtenue à partir d'expression en système bactérien : à partir de 6 cerveaux de porcs, il est possible d'obtenir environ 60 mg de tubuline avec une concentration de plusieurs mg/mL. La purification consiste essentiellement à faire des cycles de polymérisation/dépolymérisation de la tubuline de façon à séparer les MTs du reste des solutions par centrifugation et à enrichir la solution finale en tubulines. Pour plus de détails, je vous renvoie à la thèse d'Aurélien Roux qui a effectué la purification de la tubuline que j'ai utilisé pour mes expériences [Roux, 2004] (protocole initialement publié dans [Mitchison and Kirschner, 1984]). Une caractéristique importante de la tubuline que j'ai utilisée est qu'elle ne contient pas de MAPs (Microtubule Associated Protein). Il est possible d'obtenir de la tubuline très pure en utilisant une colonne échangeuse d'ions qui ne laisse passer que la tubuline chargée négativement.

A.3.2 Polymérisation des MTs

Nous avons vu au chapitre 2 que les dimères de tubuline ont tendance s'associer en présence de GTP pour former les structures cylindriques que sont les MTs lorsqu'ils sont placés à 37°. L'étape lente est l'étape de nucléation des MTs. Ensuite, la longueur des MTs augmente avec le temps et finit par saturer. L'action du taxol bloque la dépolymérisation des MTs, il est donc intéressant de l'ajouter quand les MTs ont obtenu la taille désirée de façon à les stabiliser. Suivant la concentration en tubuline utilisée, les résultats sont différents : l'utilisation d'une solution concentrée de tubuline (typiquement 10 mg/mL) permet de former beaucoup de sites de nucléation, mais les MTs sont en général moins longs une fois leur longueur maximale atteinte. En utilisant une solution moins concentrée (2 mg/mL), les MTs sont moins nombreux et plus longs. Toute la difficulté des protocoles de formation de MTs consiste à trouver une concentration optimale pour combiner à la fois la longueur et le nombre de MTs. Il est aussi possible de coupler une première étape de polymérisation concentrée (où beaucoup de sites de nucléation sont créés) à une étape de croissance où la tubuline est ensuite diluée. On peut ajouter de la tubuline marquée à la rhodamine lors de cette deuxième étape de façon à identifier l'extrémité "+" des MTs là où le MT polymérise le plus vite.

Le protocole qui a donné le plus de résultats pendant ma thèse est le suivant :

- Polymérisation à 37° d'une solution de tubuline pure mélangée à 10 % de glycérol et 1 mM de GTP pendant **30 minutes**. La tubuline utilisée provenait de la purification effectuée par Aurélien Roux en août 2002. Elle était très pure (sans MAPs) et à une concentration de 2,3 mg/mL.
- Ajout de 20 μ M de **taxol**. Comme cette étape se fait à température ambiante, les MTs se dépolymérisent un peu avant d'être stabilisés. Il faut donc les laisser **15 minutes** de plus à 37°C de façon à ce qu'ils retrouvent leur longueur maximale (une trentaine de microns).
- **Centrifugation** 15 minutes à 30 000 tours/minutes à 37°C. Cette étape permet de retirer toute la tubuline non polymérisée, ainsi que le GTP non utilisé,

qui restent en suspension. Le culot de MTs est récupéré dans un tampon de type BRB 80 qui contient 20 μM de taxol.

Les MTs préparés par cette méthode peuvent être conservés pendant quelques jours à température ambiante. Ils ne doivent pas être dilués. Remarquons que si on utilise du GTP acheté chez Roche et non pas chez Sigma, les MTs ont tendance à dépolymériser tout de suite ou au beau milieu d'une expérience.

Le **BRB 80**, tampon des MTs, contient :

- 80 mM de Pipes pH=6,8
- 1 mM de MgCl_2
- 1 mM d'EGTA

C'est un tampon bien adapté aux MTs, mais il n'est pas très bon pour toutes les autres protéines, y compris la kinésine. Le tampon est donc échangé après fixation des MTs et les expériences sont réalisées dans un tampon adapté aux kinésines, qui est proche du tampon de stockage des kinésines après dialyse (voir §C et annexe C).

Il est aussi possible d'utiliser un protocole mixte avec une première étape de polymérisation avec de la tubuline concentrée contenant des MAPs (Cytoskeleton), puis une deuxième étape de polymérisation avec de la tubuline pure d'Aurélien Roux ajoutée après 15 minutes à 37°C. L'intérêt de ce protocole mixte est que la présence de MAPs aide les MTs à se fixer sur la lamelle de verre d'observation. Le gros inconvénient est que la tubuline commerciale est moins motile. De plus, nous savons (voir §B.3.5 ch.2) que la présence de MAPs diminue le taux d'accrochage des kinésines sur les MTs [Seitz et al., 2002]. Il vaut mieux travailler avec des MTs polymérisés avec de la tubuline pure, même s'ils s'accrochent moins bien à la surface.

A.3.3 Les différentes techniques d'accrochage de MTs

Travailler avec de la tubuline très pure a des avantages et des inconvénients. Les avantages sont évidents : la pureté de la protéine et la qualité de la purification peuvent être contrôlées. D'ailleurs, même s'il est possible d'acheter de la tubuline "pure" dans le commerce, tous les grands laboratoires qui travaillent avec des MTs purifient eux-même leurs composants. Il semblerait en effet que la tubuline commerciale soit "moins active", c'est-à-dire que les moteurs moléculaires avancent moins bien, voire pas du tout, sur des MTs polymérisés avec une telle tubuline.

En revanche, il est extrêmement difficile de fixer de façon irréversible des **MTs préparés avec de la tubuline très pure** sur une surface de verre. Ceci est pourtant capital si on veut pouvoir caractériser ce qui se passe le long des tubes de membrane, sans mouvement indésirable des MTs. Nous allons donc faire l'inventaire des différentes techniques d'accrochage possibles. La première étape commune à tous les protocoles (sauf mention contraire) consiste à nettoyer les surfaces de verre de façon à ce qu'elles soient propres. Les lamelles de verre sont donc lavées avec un détergent (Decon 90, England), soniquées et rincées à l'eau milliQ³ puis à l'alcool.

³eau désionnisée

A. Préparation des différents composants

- La première façon de fixer des MTs sur une surface de verre tient compte du fait que les MTs sont chargés négativement, tout comme le verre (d'où la grande difficulté de les maintenir ensemble). Ainsi, en recouvrant les surfaces de verre de polymères chargés positivement, les MTs s'attachent aux polymères qui s'accrochent au verre. Le polymère le plus utilisé est la **poly(L)-lysine** (Sigma). La poly-lysine (0,1% w/v) est diluée 10 fois dans de l'eau milliQ et est incubée sur la surface de verre de la chambre d'observation durant 2 minutes puis rincée à l'eau milliQ avant d'être séchée grâce à un flux d'azote gazeux. Comme souvent, la qualité du revêtement dépend de celle de la surface de verre qui est beaucoup plus difficile à maîtriser. En utilisant le protocole de lavage des lamelles présenté ci-dessus, les résultats ne sont pas excellents puisque les MTs ne s'accrochent à la surface qu'en certains points. Ils restent donc pour la plupart en solution ou bien se décrochent après quelques rinçages. De plus, lorsque les MTs ont quelques jours, la poly-lysine a aussi tendance à les faire s'associer sous forme de faisceaux.
- Une deuxième technique consisterait à utiliser un autre polymère positivement chargé, le **PEI** (poly-éthylène-imine), à la place de la poly-lysine. Il semble cependant que ce polymère "englué" les MTs, les rendant complètement inaccessibles aux kinésines (en utilisant du PEI 1/1000). En effet, aucun événement d'accrochage de billes n'a pu être observé lors d'un bead assay (voir ch.2 B.2.1). D'autres essais pourraient éventuellement être réalisés.
- Il est aussi possible d'utiliser des **surfaces silanisées** avec des fonctions amines, de manière à fixer les MTs de façon covalente à la surface. [Coy et al., 1999b] ont par exemple utilisé des solutions à 20% de 3-aminopropyl triéthoxysilane dans de l'acétone, incubé pendant 5 min avec les lamelles de verre pour fonctionnaliser les surfaces.
- Il est aussi possible de recouvrir la surface de verre de **MAPs** (obtenus comme sous-produits de la purification de tubuline) par adhésion non spécifique. Les MTs s'accrochent bien à la surface; cependant, comme nous l'avons mentionné auparavant, la présence de MAPs modifie les paramètres physiques de la kinésine. Cette solution n'est donc pas adaptée pour des mesures quantitatives de taux d'attachement.
- Il est aussi possible de fixer sur la surface de verre, de l'**anti-tubuline**, avant l'injection de MTs. C'est une technique utilisée dans l'équipe de T. Surrey à l'EMBL qui semble donner de bons résultats, mais que je n'ai pas eu le temps d'utiliser. Le protocole exact doit être publié cette année.
- Les meilleurs résultats que nous ayons obtenus n'utilisent aucun composant supplémentaire pour la fixation des MTs (polymères, protéines, anticorps). Il suffit juste de passer la lamelle de verre (ESCO, USA) au **plasma pendant 30 s**, de construire la chambre d'observation avec cette lamelle et d'injecter les MTs immédiatement après. Le plasma permet de nettoyer la surface de verre de toute

contamination organique, et de rendre la couche d'oxyde très réactive en créant des liaisons SiOH (silanol) qui vont réagir avec les MTs. C'est finalement ce protocole que j'ai utilisé pour faire mes expériences.

Après le traitement de surface adéquat, puis l'incubation des MTs, les surfaces recouvertes de MTs sont ensuite passivées en utilisant de la caséine (purifiée à partir de lait de vache, SIGMA) diluée à environ 5 mg/mL dans le tampon des kinésines. Dans tous les cas, les MTs sont plus ou moins orientés par le flux d'injection dans la chambre d'observation.

A.4 Les GUVs

A.4.1 Préparation par électroformation

La technique classique pour former des vésicules géantes unilamellaires (GUVs) a été mise au point par Angelova et al. [Angelova et al., 1992] puis modifiée par Mathivet et al. [Mathivet et al., 1996]. Elle consiste à faire gonfler un film de lipides (fig. 4.5) déposé sur une surface de verre conductrice dans une solution aqueuse non saline, en présence d'un champ électrique alternatif. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que les vésicules sont obtenues de façon reproductible et sont :

- unilamellaires
- relativement monodisperses
- géantes et sphériques (diamètre entre 30 et 50 μm).

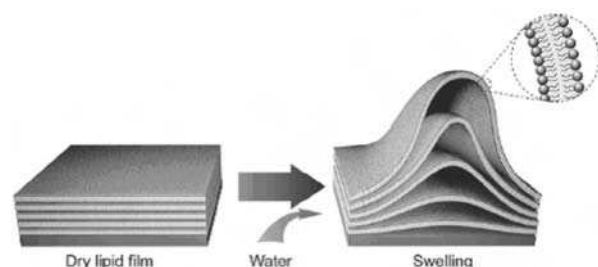


FIG. 4.5 – Schéma de principe du gonflement d'un film de lipides en présence d'eau. Site internet : www.ecs.umass.edu/hamilton/2003/juan_avendano.htm

Ce sont autant d'avantages que la pousse dite "spontanée" (en l'absence de champ électrique) ne peut apporter. Dans ce cas, les vésicules sont beaucoup moins monodisperses, et sont à 95% multilamellaires.

Pour réaliser cette technique au laboratoire, nous utilisons des lames de verre recouverte d'ITO (Indium Titane Oxide), qui les rend conductrices (10 Ω /sq., PGO, Germany). Le protocole est le suivant :

1. Sur chaque face couverte d'ITO des deux lames de la chambre de pousse est déposé un film de lipides en solution dans du chloroforme, par l'intermédiaire d'une seringue Hamilton. En général, environ 10 μL de lipides à 0,5 mg/mL sont déposés⁴, sur sur une surface de l'ordre de 2 cm². La surface semble irisée après le dépôt et l'évaporation du chloroforme.

⁴les solutions de chloroforme à 0,5 mg/mL sont conservées un mois et sont issues de solutions

2. Les dernières traces de chloroforme sont ensuite asséchées en laissant les lames de pousse de 1h à une nuit entière dans une enceinte à vide (quelques dizaines de Torr).
3. Les lames sont espacées d'environ 1 mm par des morceaux de téflon qui maintiennent les électrodes de cuivre (voir fig. 4.6(A)). L'ensemble est maintenu par une pâte à sceller (Vitrex, Danemark).
4. La solution qui va faire gonfler le film de lipides est ensuite injectée. Cette solution ne peut pas être très saline (maximum 10 mM) car les sels écrantent les effets du champs électrique appliqué. En général, on utilise du sucrose à une pression osmotique contrôlée. Ce sucrose se retrouvera à l'intérieur des vésicules après électroformation, et permettra aux vésicules de sédimenter si elles sont injectées dans un milieu (de même pression osmotique pour ne pas exploser) moins dense (milieu aqueux salin dans notre cas, glucose dans d'autres).
5. La chambre est placée aux bornes d'un générateur de tension alternative, qui va délivrer d'abord une rampe de tension sinusoïdale ($f \sim 10$ Hz) de valeur efficace croissante (de 20 mV à 1,1 V par paliers de 6 minutes). Cette étape permet la formation des vésicules. La tension reste ensuite fixée à 1,1 V pendant 1h30, ce qui permet la pousse des vésicules. Elles forment alors une mousse. Les vésicules sont ensuite séparées de la surface par action d'une tension rectangulaire à 4 Hz, de tension efficace 1,5 V pendant 30 minutes (voir fig. 4.6(B)).

La figure 4.7 montre l'observation au microscopie de la croissance des vésicules dans la chambre de pousse pendant les deux premières heures d'électroformation. On observe bien le rayon des vésicules augmenter de 1 à une trentaine de microns et saturer après deux heures de pousse. Le plan de focalisation est déplacé au cours du temps de façon à garder net l'équateur des vésicules formées. Après 3h d'électroformation, il y a plusieurs couches de vésicules empilées au dessus de la surface ITO.

A.4.2 Tension de membrane des vésicules électroformées

Un des inconvénients de cette technique de formation de vésicules est que la tension initiale des vésicules est assez élevée⁵. Une façon de rendre les vésicules plus fluctuantes est de les faire pousser à 4°, puis de les observer à température ambiante. En effet, le coefficient de dilatation thermique des membranes étant plus élevé que celui de la solution, l'augmentation de température augmente le rapport surface/volume des vésicules et les rend plus fluctuantes. De la même façon, il est aussi préférable de laisser les vésicules reposer à 4° une journée avant de les transférer dans une chambre d'observation.

Pour faire pousser des vésicules constituées d'un mélange équimolaire 1 :1 de SM et de cholestérol (les vésicules sont appelées "rigides"), il est en revanche préférable

stocks à 10 mg/mL conservées pendant 1 an maximum. Cette précaution d'emploi est une conséquence de la dégradation lente des lipides en présence d'eau qui se condense dans les flacons à chaque cycle d'ouverture/fermeture. L'hydrolyse des lipides en lysolipides est limitée lorsque les flacons sont conservés à -20°C dans une atmosphère contenant de l'argon.

⁵voir ch.2 §C.3.1

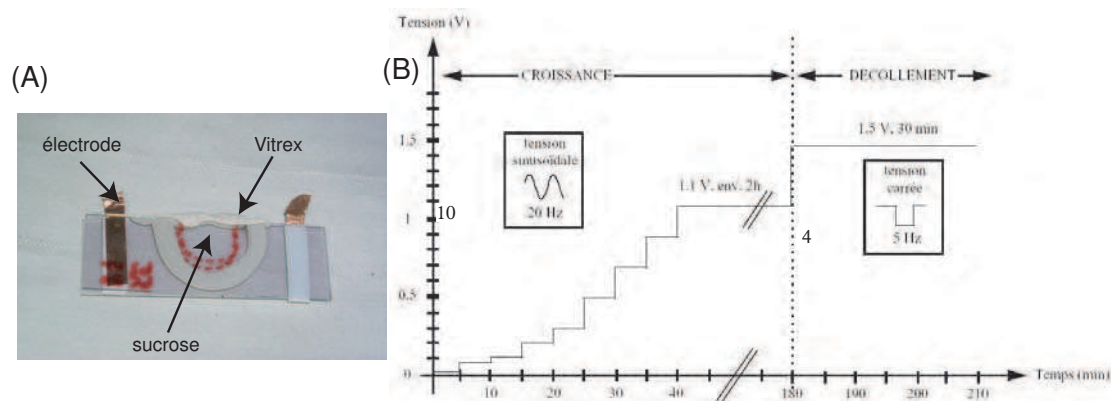


FIG. 4.6 – (A) Photo d'une chambre de pousse. Les lipides ont été déposés sur chaque face conductrice. Une électrode est placée sur chaque plot en téflon qui sert d'espaceur (1 mm), et un boudin de vitrex sert à délimiter l'intérieur du réservoir de la chambre de pousse autour du trait de feutre. La chambre est remplie de sucrose, puis scellée enfin par du vitrex. La chambre est alors placée aux bornes d'un générateur de tension alternative, non représenté et une rampe de tension est imposée. Photo : J. Solon. (B) Rampe de tension appliquée aux bornes de la chambre de pousse. On observe deux phases : une phase de croissance, à 10 Hz avec une tension sinusoïdale, puis une phase de décollement à 4 Hz, avec une tension rectangulaire. D'après [Manneville, 1999].

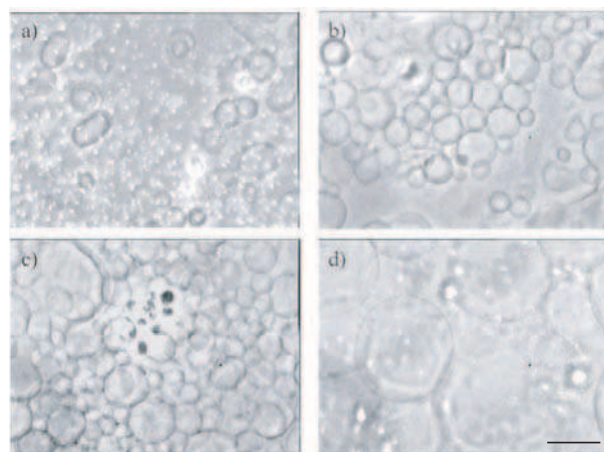


FIG. 4.7 – Image d'une préparation de vésicules d'EPC au cours de l'électroformation après (a) 30 minutes, (b) 55 minutes, (c) 95 minutes, (d) 120 minutes. Barre=10 μm . D'après [Manneville, 1999].

de les faire pousser à 50° , c'est-à-dire au-dessus de la température de transition du mélange. On obtient des vésicules relativement tendues à température ambiante. Cependant, il est très difficile de moduler la tension de ces vésicules comme nous le verrons au paragraphe B.3.

A.4.3 Les lipides utilisés

✓ *EPC* ou *SM/Chol 1 :1* suivant la rigidité de courbure désirée

La rigidité de courbure est essentiellement déterminée par la composition en lipides

A. Préparation des différents composants

de la vésicule (cf ch.2). Nous avons travaillé avec deux compositions différentes de lipides : EPC ou SM/Chol 1 :1. La plupart des expériences ont été réalisées avec des vésicules contenant de l'EPC (mélange de lipides d'œuf) dont la composition est représentée figure 4.8. Ce mélange est en phase fluide à température ambiante, donc dans les conditions de nos expériences.

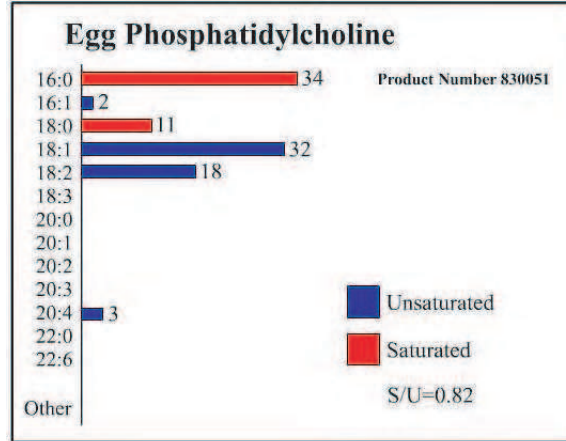


FIG. 4.8 – Composition lipidique de l'EPC, d'après www.avanti.com.

De plus, la rigidité de courbure a été bien caractérisée par différents groupes [Duwe et al., 1990, Olbrich et al., 2000, Pécreaux et al., 2004], et la présence de moins de 1% d'autres lipides (fluorophores, lipides biotinylés) ne change pas cette valeur [Evans and Rawicz, 1997]. C'est une membrane très flexible :

$$\boxed{\kappa_{EPC} = 10 \pm 1 K_B T} \quad (4.1)$$

Pour changer de façon importante la rigidité de courbure, nous avons utilisé des vésicules qui contiennent un mélange équimolaire de SM et de cholestérol (SM/Chol 1 :1). Ces vésicules "rigides" ont un κ qui a été mesuré par Cuvelier et al. [Cuvelier et al., 2005b] par la technique de coalescence de tubes (voir ch.3 §A.3.4). Ils ont trouvé :

$$\boxed{\kappa_{SM/Chol} = 65 \pm 6 K_B T} \quad (4.2)$$

✓ Les lipides fluorescents pour observer la membrane

Pour marquer la membrane des vésicules en fluorescence, nous avons utilisé plusieurs sortes de lipides fluorescents (Molecular Probes) suivant le type d'expériences réalisées.

1. Pour les expériences de FRAP⁶, visant à déterminer le coefficient de diffusion de lipides dans une membrane, nous avons utilisé un lipide marqué à la

⁶Voir §B.2

Chapitre 4. Comment contrôler les paramètres physiques et biochimiques pertinents dans le système minimal *in vitro*

fluorescéine (excitation : 488 nm, émission : 510 nm) qui émet dans le vert : le **DHPE-FITC** (représenté fig. 4.9(A)). Cependant, la fluoresceine se photoblanchit très rapidement, et, de plus, peut inhiber l'action de la kinésine [Hopkins et al., 2000]. Nous ne l'avons donc pas utilisée pour d'autres types d'expériences.

2. Les lipides marqués avec une rhodamine (**DHPE-TRITC** : 560/579 nm) ou du Texas Red (**DHPE-Texas Red** : 582/601 nm) et qui émettent dans le rouge sont moins sujets au photoblanchiment. Nous avons donc utilisé ces lipides pour marquer de façon uniforme les membranes, et plus particulièrement le lipide-Texas Red (représenté fig. 4.9(B)). Il était aussi possible d'utiliser du BODIPY-DHPE (530/550 nm), cependant, ces lipides semblent changer de façon importante les propriétés de la membrane qui les contient lorsqu'ils sont illuminés [Solon, 2004], nous avons donc abandonné leur utilisation.

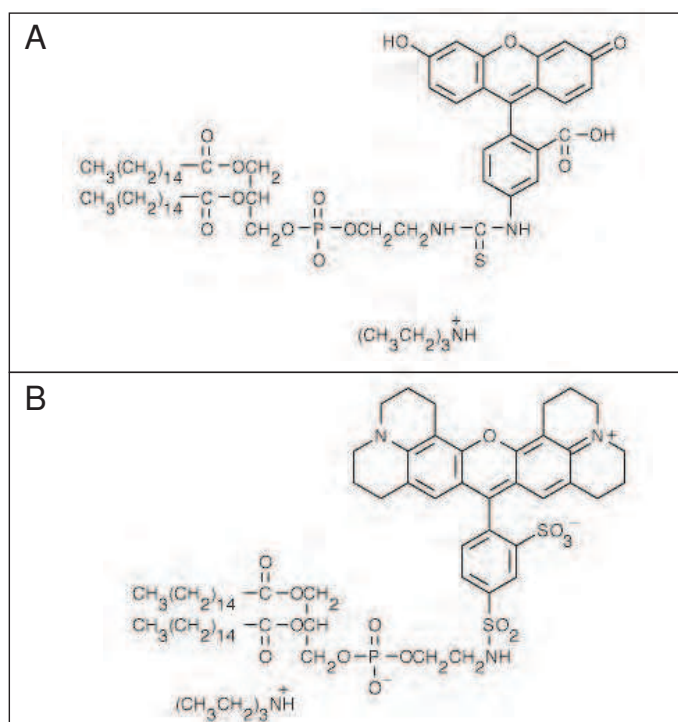


FIG. 4.9 – Structures des lipides fluorescents utilisés. (A) DHPE-FITC. (B) DHPE-Texas Red. D'après www.probes.com.

✓ *Les lipides biotinylés pour accrocher les moteurs*

Les moteurs moléculaires sont accrochés à la membrane par l'intermédiaire de la liaison streptavidine/biotine. Le nombre de moteurs présents initialement à la surface de la vésicule est donc directement lié au nombre de lipides biotinylés présents dans la membrane. Nous avons utilisé trois sortes de lipides biotinylés dont les formules chimiques sont représentés figure 4.10 :

A. Préparation des différents composants

1. **DOPE-Cap-Biot** (Di-oleyl-phosphatidyl-ethanolamine-Cap-Biotine, C18 :1, Avanti) : c'est un lipide avec une tête PE⁷ et une biotine séparée par un petit espaceur.
2. **DSPE-PEG₂₀₀₀-Biot**(Di-sterayl-phosphatidyl-ethanolamine-PEG-biotine, C18 :0, Avanti) : c'est aussi un lipide avec une tête PE mais la biotine est séparée de la tête par une longue chaîne hydrophile de PEG (MW=2000 g/mol soit 46 monomères), ce qui rend la biotine plus accessible.
3. **DSPE-Rhod-Biot** (Di-sterayl-phosphatidyl-ethanolamine-Rhodamine-Biotine, C18 :0) : lipide qui a à la fois une rhodamine (fluorophore qui émet dans le rouge $\lambda_{exc} = 545/\lambda_{em} = 570$ nm) et une biotine sur la tête. La biotine est aussi un peu espacée de la tête polaire. Ce lipide a été synthétisé à l'Institut Pasteur de Lille, grâce à une riche collaboration avec le groupe de Line Bourel-Bonnet [Jolimaitre et al., 2005]. Si on a un protocole permettant de fixer un moteur par lipide, on aura alors un moteur par fluorophore. Ceci va nous permettre de faire des analyses quantitatives de fluorescence pour caractériser la distribution des moteurs moléculaires le long d'un tube de membrane.

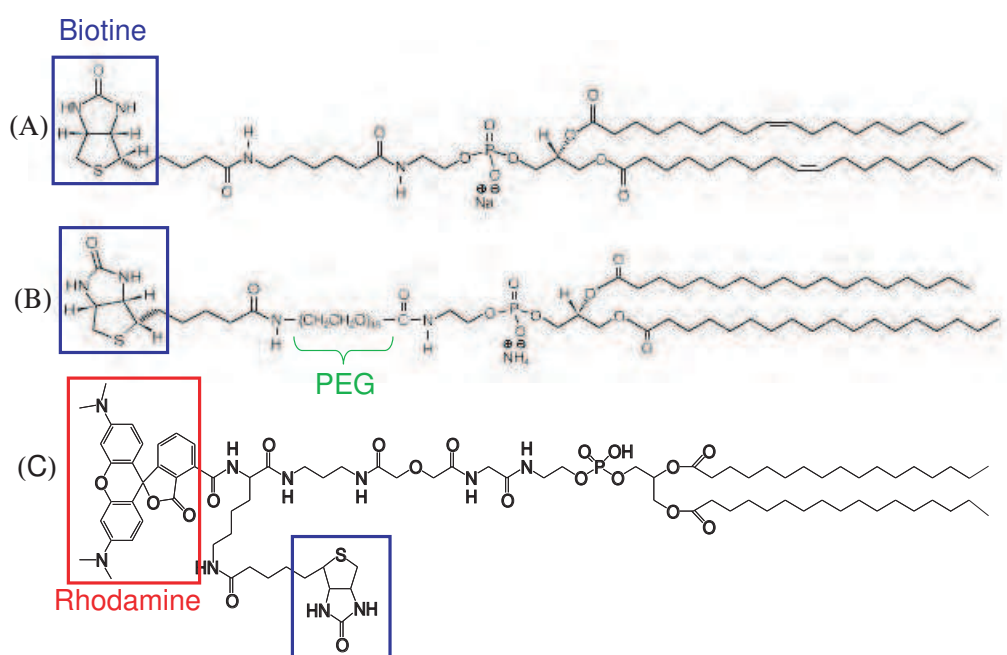


FIG. 4.10 – Structure des lipides biotinylés utilisés (A) DOPE-Cap-Biot (Avanti polar lipids); (B) DSPE-PEG₂₀₀₀ (Avanti polar lipids); (C) DSPE-Rhod-Biot, qui a à la fois une biotine et une rhodamine [Jolimaitre et al., 2005].

⁷voir ch.2 §C.1.2 et annexe A

B Mesure des différents paramètres

Nous avons vu qu'il y a un certain nombre de propriétés physiques du système qu'il faut déterminer pour décrire la formation et la croissance de tubes de membrane tirés par des kinésines. Certains paramètres caractéristiques de la kinésine-1 sont disponibles dans la littérature, comme :

- le taux de détachement des kinésines d'un MT, $k_u^0=0,42\pm 0,03\text{ s}^{-1}$ [Vale et al., 1996],
- la longueur caractéristique de croissance exponentielle, $a=1,3\pm 0,1\text{ nm}$ [Schnitzer et al., 2000]
- la force d'arrêt d'une kinésine conventionnelle $F_S=6,3\pm 0,7\text{ pN}$ [Visscher et al., 1999]

Nous supposons que ces paramètres qui sont liés directement au domaine moteur de la kinésine sont les mêmes pour notre kinésine tronquée. Nous avons mesuré ou contrôlé les paramètres plus spécifiques de notre système, à savoir :

- la vitesse des kinésines en l'absence de force appliquée, V_0 , dans exactement les mêmes conditions expérimentales que nos expériences de formation de tubes de membrane
- le coefficient de diffusion des kinésines à la surface de la vésicule, D , par FRAP
- la tension de membrane, σ
- la force nécessaire pour tirer un tube, F_0 , qui est bien sûr liée à la tension de membrane, par pince optique. Cette mesure permet de vérifier que la tension de membrane correspond bien à celle que l'on a imposée.
- la densité de moteurs à la surface de la vésicule ρ_∞ , contrôlée par la concentration en lipides biotinylés dans la membrane.

B.1 Vitesse des kinésines - "bead assays"

Nous avons mesuré la vitesse V_0 des kinésines en l'absence de force appliquée en faisant des "bead assays" (voir § ch.2 B.2.1) dans des conditions similaires aux expériences de formation de tubes de membrane (tampon, lot de kinésines et tubulines). Cette vitesse est caractéristique du moteur utilisé. Le protocole consiste en trois étapes qui vont être détaillées :

- la préparation des billes recouvertes de kinésines
- la préparation d'une lamelle recouverte de MTs stabilisés
- injection des billes-kinésines dans la chambre d'observation en présence d'ATP

B.1.1 Préparation des billes recouvertes de kinésines

Les billes utilisées sont des billes de $0,49\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre (Bangs Laboratories, Carmel IN), recouvertes de streptavidine (conservation à 4°). Il faut tout d'abord resuspendre les billes (solution mère contenant 5.10^{11} microsphères/mL) puis les soniquer de façon à ne pas avoir d'agrégat de billes, et ajouter de la caséine de façon à passiver la surface en bloquant les sites d'adhésion non spécifique. Jusqu'à

l'injection dans la chambre à flux, toutes les étapes impliquant les billes sont réalisées à 4° (dans de la glace) :

1. Mélanger 5 μL de billes avec 2,5 μL de caséine (5 mg/mL)
2. Soniquer 15 minutes
3. Ajouter 30 μL de tampon IMI (tampon des kinésines)
4. Mélanger 1,5 μL de billes diluées avec 2,5 μL de kinésines diluées 10 fois (par rapport à la concentration obtenue après dialyse soit $\sim 1 \mu\text{M}$).
5. Laisser incuber 15 minutes

Le **tampon IMI** contient :

- 50 mM Imidazole pH=6,7
- 50 mM NaCl
- 1 mM MgCl_2
- 2 mM EGTA

B.1.2 Préparation d'une lamelle recouverte de MTs stabilisés

Les lamelles d'observation (carré 18x18 mm) sont passées au plasma de façon à les rendre réactives, avant d'être insérées dans une chambre à flux (fig. 4.11).

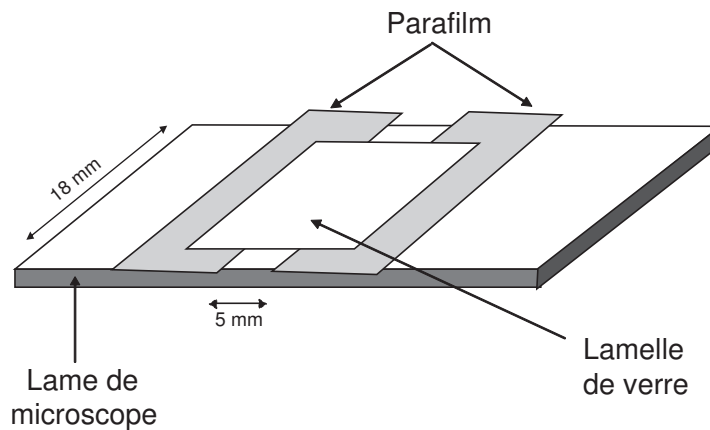


FIG. 4.11 – Schéma d'une chambre à flux constituée d'une lame de microscope nettoyée à l'éthanol, de deux morceaux de parafilm espacés de 5 mm environ et d'une lamelle 18x18 mm passée au plasma. L'ensemble est chauffé à 150° sur une plaque chauffante de façon à faire fondre le parafilm et créer une chambre fermée. Le volume final est de l'ordre de 10 μL , puisque l'épaisseur de la chambre est de l'ordre de 100 μm . C'est une chambre à flux puisqu'il est possible d'injecter du liquide d'un côté (par capillarité), et d'aspirer au niveau de l'autre ouverture grâce à un papier absorbant.

Le protocole est le suivant :

1. Passer 30 s la lamelle au plasma

2. Construire une chambre à flux avec la lamelle et une lame de microscope
3. Injecter les MTs à la concentration souhaitée (environ 10 μL , le volume de la chambre)
4. Laisser incuber 5 minutes
5. Rincer avec 2 fois 20 μL de tampon IMI (soit 4 fois le volume de la chambre à flux)
6. Injecter 20 μL de caséine à 5 mg/mL de façon à passiver la surface de verre, là où il n'y a pas de MTs.
7. Rincer 2 fois avec 20 μL de tampon IMI.

B.1.3 Injection des billes

Pour effectuer le bead assay, il suffit de :

1. Rincer la chambre à flux avec du MB 1X
2. Injecter les billes recouvertes de kinésines (4 μL) mélangées à 4 μL de MB2X
3. Sceller la chambre à flux pour limiter les phénomènes d'évaporation.

Le MB est le Motility Buffer qui permet donc la motilité des kinésines. Il contient du tampon IMI auquel est ajouté entre autres de l'ATP :

- MB 1X : tampon IMI + 1 mM d'ATP + 20 μM taxol + 5 mM DTT
- MB 2X : tampon IMI + 2 mM d'ATP + 40 μM taxol + 10 mM DTT

Il est toujours préférable de mettre du taxol dans les tampons pour limiter la dépolymérisation des MTs au cours des expériences. Le DTT sert d'anti-oxydant et permet de préserver les kinésines d'une oxydation liée à l'oxygène de l'air.

La position de la bille sur les différentes images (obtenues en DIC) enregistrées lors de son déplacement est détectée par analyse de niveaux de gris, en effectuant un seuillage. On remarque en effet fig. 4.12(B) que la bille a une partie très noire et une partie très blanche qu'il est possible de positionner grâce à ce seuillage. Un programme a été mis au point dans le groupe de théorie à l'Institut Curie par Konstantin Zeldovich pour automatiser cette détection sur tout un film. A partir de la courbe de position des billes sur des trajets de quelques microns, il est possible de calculer leur vitesse moyenne. Les résultats obtenus sont présentés figure 4.12. Nous avons trouvé une vitesse moyenne égale à :

$$\boxed{V_0 = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{s}} \quad (4.3)$$

où l'incertitude reflète la dispersion des données, en bon accord avec les mesures faites par d'autres équipes sur la kinésine-1 [Howard et al., 1989, Svoboda et al., 1994, Coy et al., 1999b].

Nous n'avons pas travaillé en conditions de moteur unique (une kinésine par bille); en effet, Block et al. ont montré que le nombre de kinésines par billes ne modifiait pas la vitesse de la bille [Block et al., 1990]. Le nombre de moteurs utilisés était de l'ordre de 1 moteur pour 25 sites d'accrochage sur la bille. Lorsque le nombre

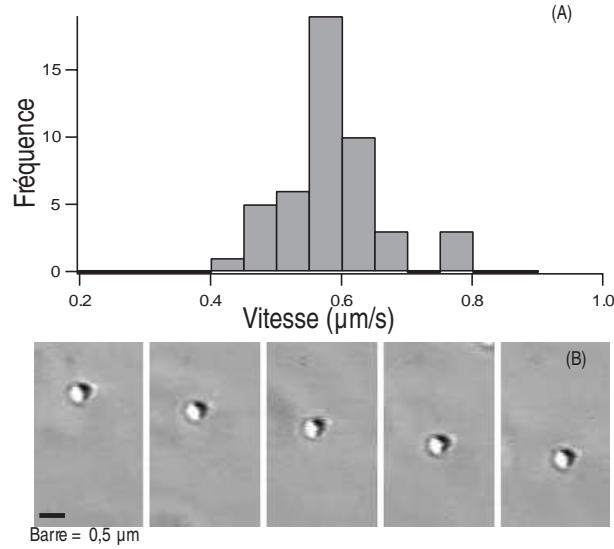


FIG. 4.12 – (A) Histogramme montrant la distribution des vitesses de la kinésine-1 mesurées avec des "bead assays" dans des conditions similaires aux "tube assays" du chapitre 4. La vitesse moyenne obtenue est : $V_0 = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{s}$. (B) Séquence d'images en DIC d'un bead assay, une image par seconde. La bille a un diamètre de $0,5 \mu\text{m}$ (on ne voit pas le MT). Barre = $0,5 \mu\text{m}$.

de moteurs par bille est assez élevé, ou bien lorsqu'il y a des moteurs libres en solution dont une partie est liée aux MTs, la dispersion des vitesses est beaucoup plus grande (voir annexe B).

Pour caractériser V_0 , il était important d'utiliser le tampon IMI, qui est le même tampon que celui utilisé pour faire pousser des tubes, et non pas le BRB 80 (tampon des MTs). En effet, la vitesse des kinésines dépend beaucoup de la salinité, et particulièrement de la présence en MgCl_2 . C'est pourquoi, en utilisant du BRB 80, G. Cappello et A. Roux, avec les mêmes kinésines et la même concentration en ATP, ont trouvé des vitesses inférieures (autour de $0,45 \mu\text{m}/\text{s}$) [Roux et al., 2002, Cappello et al., 2003]. On peut remarquer finalement que, quel que soit le lot de kinésines utilisé, pour des microtubules préparés avec toujours la même tubuline, les vitesses V_0 trouvées durant toute ma thèse sont restées autour de $0,6 \mu\text{m}/\text{s}$.

B.2 Mesure du coefficient de diffusion des moteurs à la surface de la vésicule par FRAP

La technique de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) repose essentiellement sur le photoblanchiment de molécules fluorescentes. Nous allons donc commencer par décrire ce phénomène avant de détailler le principe de la technique. Enfin, nous expliquerons comment nous l'avons utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion des kinésines à la surface d'une vésicule.

B.2.1 Photoblanchiment de molécules

Le processus normal de fluorescence est de réémettre l'énergie absorbée sous forme de photons de longueur d'onde plus grande que celle qui a servi à l'excitation. Toutefois, en présence d'une intensité très forte de lumière, une forte proportion de molécules existent dans l'état excité de forte énergie, et elles peuvent perdre des électrons pour donner des radicaux libres, très réactifs. Les molécules initialement fluorescentes sont donc profondément modifiées par ces réactions qui "tuent" leur fluorescence de façon irréversible. On appelle ce phénomène "photoblanchiment". On peut réaliser cette expérience de photoblanchiment sous microscope en utilisant les équipements de microscopie de fluorescence. L'avantage est que l'on peut focaliser le faisceau de photoblanchiment sur une petite surface du champ d'observation et donc ne blanchir que les molécules qui sont dans cette zone.

B.2.2 Principe de la technique de FRAP

La technique de FRAP a été mise au point dans les années 70 pour mesurer le mouvement latéral à 2D de particules fluorescentes à la surface d'une membrane [Axelrod et al., 1976]. Le principe consiste à photoblanchir une zone de la membrane grâce à un laser puis d'enregistrer le signal de retour de fluorescence dans la zone éteinte. La fluorescence est rétablie par diffusion de particules venant de la surface environnante (fig. 4.13(A)).

Les courbes de retour de fluorescence enregistrées n'ont de sens que lorsque le temps durant lequel a lieu le photoblanchiment τ_{PhotoB} est inférieur au temps caractéristique du mouvement des lipides dans la membrane τ_{lipide} .

$$\boxed{\tau_{PhotoB} < \tau_{lipide}} \quad (4.4)$$

Lorsque le rapport des deux temps n'est pas petit devant 1, la surface d'extinction n'est pas très bien délimitée.

Le retour de fluorescence peut être normalisé de la façon suivante :

$$f(t) = \frac{F(t) - F(0)}{F(\infty) - F(0)} \quad (4.5)$$

où $F(t)$ est la fluorescence de la zone photoblanchie à l'instant t , $t=0$ correspondant à l'instant juste après le photoblanchiment et $t=\infty$ au temps de saturation de la courbe de fluorescence. Ce temps ne peut pas être infini puisque le fait même d'observer la surface diminue aussi sa fluorescence. Un exemple de retour de fluorescence est représenté figure 4.13(B). La mesure du coefficient de diffusion à partir de cette technique n'est possible rigoureusement qu'en géométrie plane. Lorsque la membrane a une autre géométrie, aucune analyse ne permet encore de déterminer correctement D des mesures.

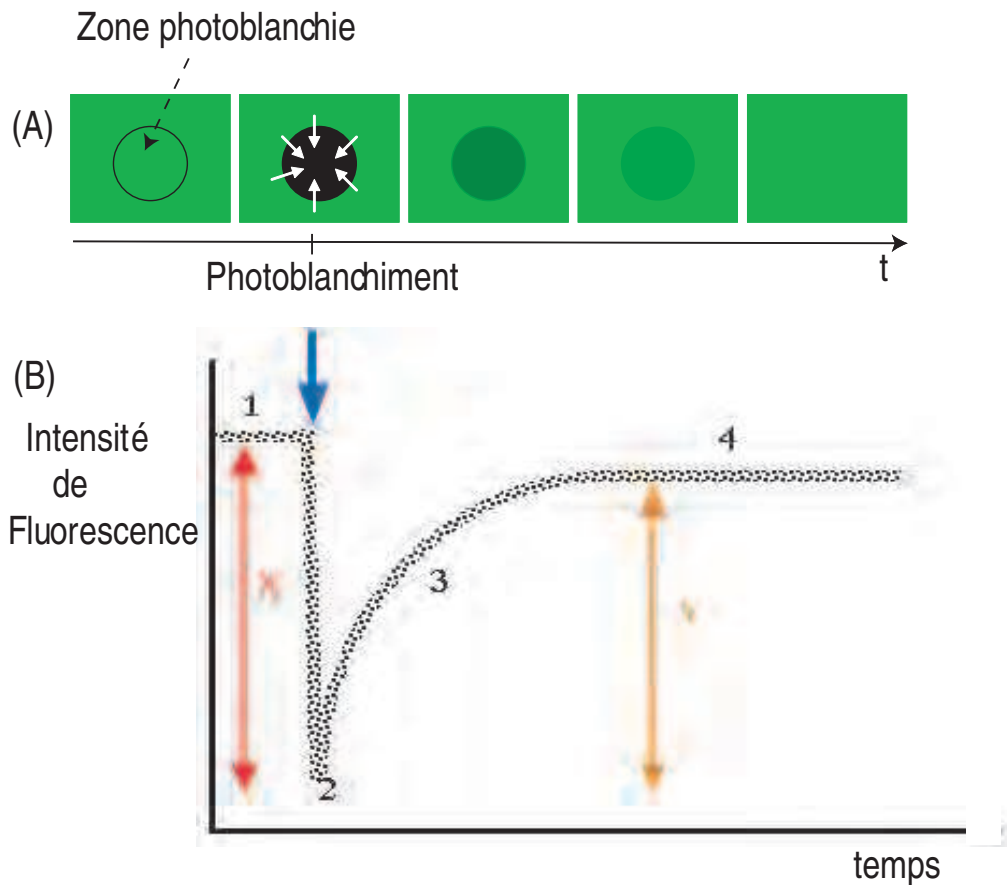


FIG. 4.13 – (A) Schéma représentant le principe des expériences de FRAP. Une zone de la membrane est photoblanchie par l'intermédiaire d'un laser puissant, puis le retour de fluorescence dans la zone photoblanchie est enregistré en fonction du temps (la fluorescence est alors excitée avec une intensité de capture beaucoup plus faible). La fluorescence revient par diffusion des particules fluorescentes environnantes. Il est donc possible d'extraire le coefficient de diffusion des particules marquées par cette technique. (B) Représentation graphique d'une courbe classique d'intensité de fluorescence obtenue lors d'une expérience de FRAP. (1) montre le niveau de fluorescence avant le photoblanchiment (2). (3) : retour de fluorescence par diffusion. (4) : stabilisation du niveau de fluorescence. Y/X représente le pourcentage de recouvrement de fluorescence, qui vaut en général 1 (soit 100%) sauf lorsqu'il y a une fraction immobile de fluorophore ($1-Y/X$).

B.2.3 Application à la mesure du coefficient de diffusion D

Pour mesurer le coefficient de diffusion du complexe kinésine-streptavidine-lipide biotinyllé à la surface de la vésicule, nous avons procédé de la manière suivante. Tout d'abord, la seule possibilité pour marquer en fluorescence la position des kinésines était d'utiliser de la streptavidine fluorescente. En effet, les kinésines ne sont pas fluorescentes et il n'était pas possible d'éteindre la fluorescence de la rhodamine

placée sur le lipide d'accrochage de la kinésine avec le laser Helium-Néon dont nous disposons. Il fallait énormément d'itérations pour photoblanchir de 10% la surface, et la condition fixée par l'eq. 4.4 n'était alors pas remplie. Le seul composant qui restait dans le complexe (voir fig. 4.2) était la streptavidine. Nous avons donc utilisé de la streptavidine marquée avec de la fluorescéine (FITC, $\lambda_{exc}=488$ nm/ $\lambda_{em}=510$ nm) que nous avons excitée à 488 nm (raie très intense d'un laser à argon). Il était donc possible d'éteindre la fluorescence de la FITC en utilisant un tel laser puisque cette molécule est très facilement blanchie. Nous avons supposé que le coefficient de diffusion du complexe contenant le lipide fluorescent et biotinylé (DSPE-Rhod-Biot) était identique à celui mesuré dans ces conditions.

L'acquisition d'une courbe de FRAP se fait de la façon suivante :

- Des vésicules recouvertes de streptavidine-FITC auxquelles sont attachées des kinésines sont injectées dans une chambre d'observation (fig. 4.11) et sédimentent. Elles sont alors relativement immobiles.
- En utilisant un microscope confocal, il est possible de focaliser sur la surface du dessous de la vésicule (au contact avec la lamelle de verre recouverte de caséine). C'est la seule surface plane (qui se rapproche des conditions décrites au paragraphe précédent) accessible. En effet, la surface du dessus de la vésicule est trop haute par rapport à la distance de travail de l'objectif utilisé (x63; NO :1,4 Zeiss). Nous avons vérifié, pour des vésicules pas trop grandes, que le coefficient de diffusion mesuré sur le haut de la vésicule est similaire à celui mesuré sur la surface du bas.
- Cette surface est ensuite visualisée avec la résolution minimale (64x64 pixels) de façon à acquérir la fluorescence le plus rapidement possible (environ 60 ms pour faire une image) et avec le minimum de puissance possible du laser.
- La zone qui doit être photoblanchie est sélectionnée; il s'agit d'une surface circulaire de l'ordre de $1 \mu m^2$ qui couvre pratiquement l'ensemble de la surface de contact de la vésicule.
- La zone est visualisée environ 10 fois avant d'être photoblanchie de façon à mesurer le niveau de fluorescence de référence avec une bonne précision.
- La zone sélectionnée est photoblanchie en utilisant le laser à sa puissance maximum.
- Le signal de retour de fluorescence est enregistré à une cadence d'environ 1 image toutes les 60 ms (voir un exemple fig. 4.14).

Le signal de retour de fluorescence f de la zone photoblanchie est tracé en fonction du temps. Le niveau de fluorescence revient au niveau de référence, avant photoblanchiment, ce qui montre bien qu'il n'y a pas de fraction immobile de fluorophores. Un exemple de courbe obtenu est représenté figure 4.15.

Il est ensuite possible d'ajuster la courbe de retour de fluorescence avec l'équation 4.6 contenant un seul paramètre : le temps caractéristique τ_D , lié au coefficient de diffusion D recherché et au rayon w de la zone photoblanchie par l'équation 4.7. Les équations suivantes sont issues de [Soumpasis, 1983] :

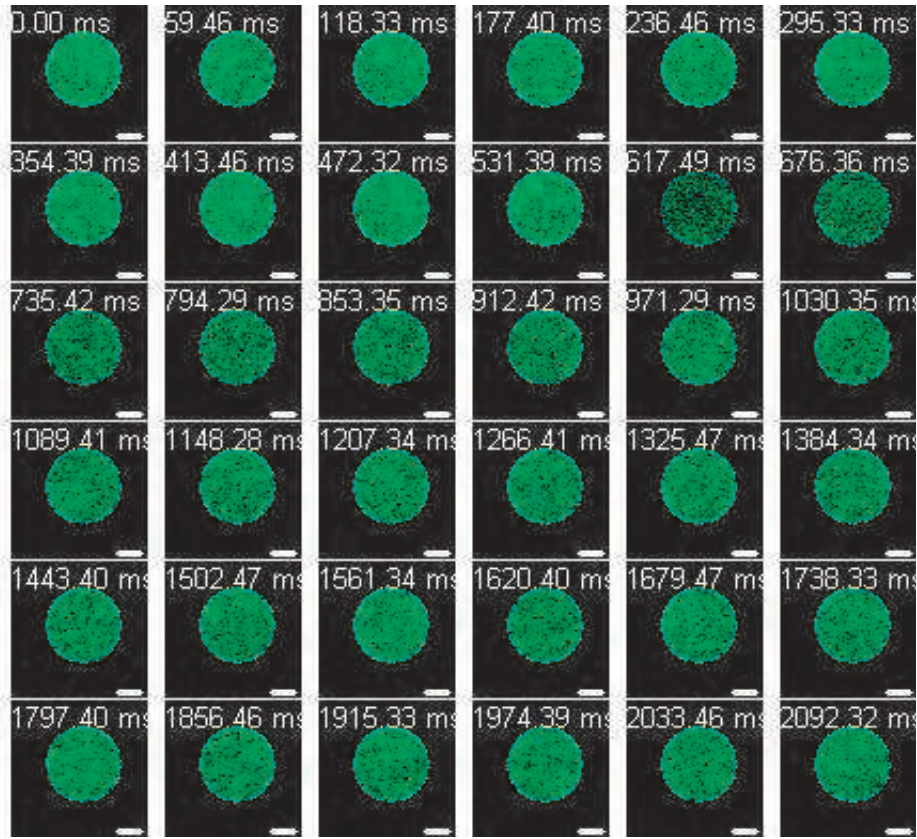


FIG. 4.14 – Exemple d’une expérience de FRAP réalisée sur la surface au voisinage du verre inférieure d’une vésicule recouverte de streptavidine-FITC et de kinésines. Le temps est affiché en haut. Le photoblanchiment a lieu à 617,49 ms. Le rayon du disque correspondant à la zone photoblanchie est de 730 nm. Le microscope utilisé est un confocal Zeiss Axiovert 200. Barre = 200 nm.

$$f(t) = \exp\left(-\frac{\tau_D}{t}\right) \left[I_0\left(\frac{\tau_D}{t}\right) + I_1\left(\frac{\tau_D}{t}\right) \right] \quad (4.6)$$

$$\text{avec } \tau_D \equiv \frac{w^2}{4D} \quad (4.7)$$

où I_0 et I_1 sont les 1^{re} et 2^{me} fonctions de Bessel modifiées venant de la forme circulaire de la zone photoblanchie, et du fait que l’on peut considérer l’intensité du laser uniforme sur cette zone balayée, large devant la taille du faisceau qui est plutôt gaussien.

B.2.4 Résultats obtenus pour D

Les expériences ont été réalisées pour différentes concentrations en lipides biotinylés (0,5% ; 1% et 5% en nombre de lipides) dans la membrane et aucune variation sur la mesure du coefficient n’a pu être observée. Les résultats obtenus pour des vésicules contenant 0,5% de lipides biotinylés sont représentés dans la figure 4.16(A).

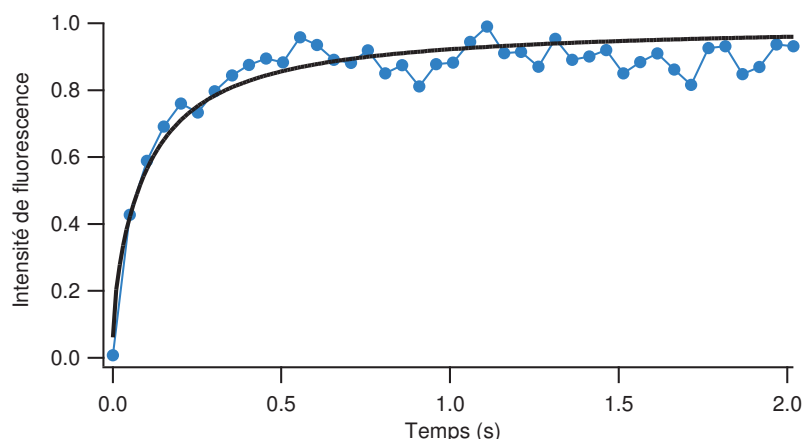


FIG. 4.15 – Exemple de courbe de retour de fluorescence après photoblanchiment, obtenue à partir d’une série d’images du type de celui de la figure B.2. La ligne continue correspond à l’ajustement à un paramètre effectué avec l’équation 4.6. Le temps caractéristique obtenu est : $\tau_D=85$ ms, qui est supérieur aux 60 ms nécessaires pour faire une image.

C’est la concentration minimale qu’il était possible d’utiliser tout en gardant une quantité suffisante de signal pour faire des mesures. Cette concentration reste cependant un peu élevée par rapport aux concentrations de travail (de 0,01 à 0,1%), mais on peut penser que, par extrapolation, la valeur de D pour ces concentrations est proche de la valeur mesurée.

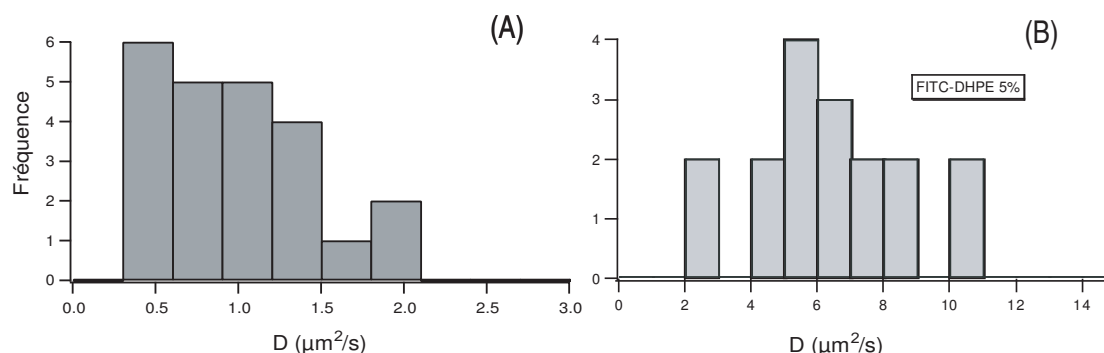


FIG. 4.16 – Histogrammes montrant les résultats obtenus pour les coefficients de diffusion mesurés par FRAP (comme décrit dans le texte) : (A) dans le cas où les vésicules utilisées contiennent 0,5% de lipides biotinylés auxquels sont accrochés de la streptavidine-FITC et des kinésines ; (B) dans le cas où la membrane de la vésicule est marquée de façon uniforme avec 5% de lipides-FITC (expérience de contrôle).

Le coefficient de diffusion trouvé (\pm la dispersion des valeurs obtenues) est :

$$D=1,0 \pm 0,5 \mu m^2/s \quad (4.8)$$

Il peut être comparé au coefficient de diffusion de lipides dans la membrane que j'ai mesuré de la même façon sur des vésicules contenant 5% de lipides-FITC (voir résultats figure 4.16(B)). Le résultat obtenu est $D_{lip}=6 \pm 2 \mu m^2/s$, en bon accord avec [Gordon et al., 1995]. Nous pouvons donc remarquer que les complexes contenant les moteurs diffusent moins vite que des simples lipides dans la membrane, mais que le coefficient reste du même ordre de grandeur. Pour être cohérent, nous aurions dû mesurer le coefficient de diffusion directement sur les tubes. Cependant, ces mesures étaient impossibles étant donné le très faible signal émis par un tube de quelques dizaines de nm de rayon, et la géométrie non plane de l'objet. Il serait éventuellement possible de calculer un facteur correctif géométrique, mais ce facteur ne change pas l'ordre de grandeur de D .

B.3 Contrôle de la tension de membrane des vésicules

B.3.1 Principe général basé sur le phénomène d'osmose

Pour contrôler la tension de membrane des vésicules, il est possible d'utiliser la loi de Laplace qui donne la relation entre le rayon d'une vésicule tendue et sa tension de membrane, par l'intermédiaire de la différence de pression osmotique (voir définition fig. 4.17) entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. Ceci n'est vrai que pour des vésicules assez tendues pour pouvoir négliger la tension initiale ($\sigma > 5.10^{-5}$ N/m).

B.3.2 Il faut imposer une différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule

Dans le cas où les membranes des vésicules sont perméables à l'eau, de l'eau peut passer à travers la membrane par osmose. En contrôlant la différence de pression osmotique entre l'intérieur Π_i et l'extérieur Π_e , il est possible d'obtenir soit des vésicules tendues, soit des vésicules fluctuantes.

- $\Pi_i > \Pi_e$. Si la pression osmotique est plus grande à l'intérieur de la vésicule, par rapport à celle à l'extérieur de la vésicule, alors de l'eau rentre dans la vésicule qui se tend (fig. 4.18(A)).
- $\Pi_i < \Pi_e$. Si au contraire, la pression osmotique à l'intérieur est plus faible qu'à l'extérieur, alors de l'eau sort de la vésicule qui devient très fluctuante (avec une tension de membrane très faible) (fig. 4.18(B)).

B.3.3 Problème lié à la perméabilité parfois réduite des membranes lipidiques

Cependant, la perméation des membranes varie beaucoup avec la composition lipidique. La figure 4.19 montre le diagramme de perméabilité de différents types de vésicules en fonction de leur composition. On remarque que pour les vésicules qui contiennent du SOPC (un des composants de l'EPC utilisé pour les expériences, voir annexe A), la perméabilité est grande (20.10^{-4} cm/s) et l'échange d'eau est rapide (5 nm parcouru en 2,5 ms). On peut donc supposer que les vésicules SOPC

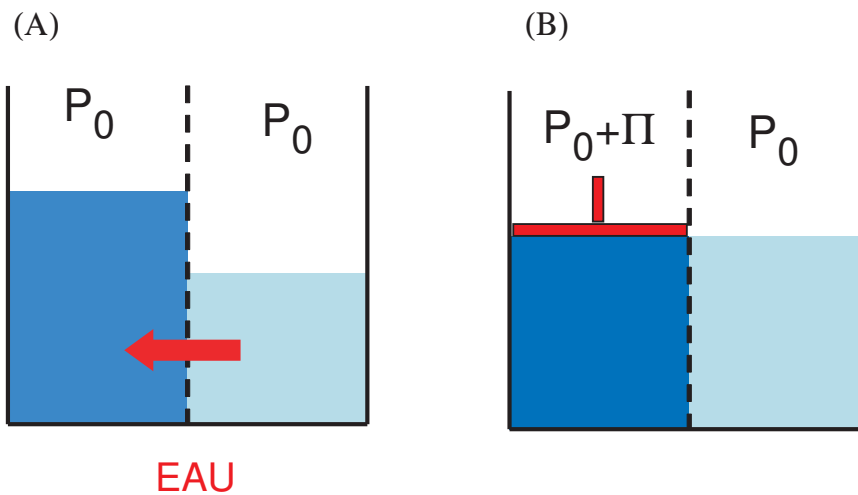


FIG. 4.17 – (A) Lorsque deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable, qui ne laisse passer que l’eau, et qu’un des compartiments contient une solution plus concentrée (à gauche) que l’autre (à droite), alors de l’eau passe du compartiment le moins concentré vers celui le plus concentré pour équilibrer les potentiels chimiques. C’est le phénomène d’osmose. P_0 correspond à la pression atmosphérique. (B) Si une pression est appliquée en plus de la pression atmosphérique de façon à annuler le flux d’eau entre les compartiments, et qu’en plus le milieu de droite ne contient que de l’eau, alors la pression mesurée correspond à la pression osmotique Π de la solution concentrée.

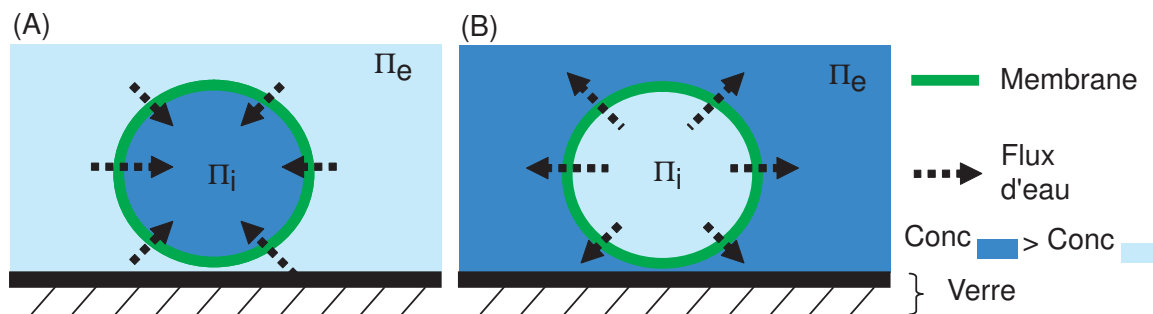


FIG. 4.18 – (A) Vésicule placée dans un milieu hypotonique ($\Pi_i > \Pi_e$). L’eau rentre dans la vésicule par osmose et la tend. (B) Vésicule placée dans un milieu hypertonique ($\Pi_i < \Pi_e$). L’eau sort de la vésicule qui devient fluctuante.

(et de même pour les vésicules EPC) adoptent de façon instantanée leur tension d’équilibre dès l’injection dans le milieu de la chambre d’observation qui constitue le milieu extérieur aux vésicules. En revanche, dans le cas des mélanges équimolaires SM/Chol (appelé SPM :Chol (1 :1) sur le graphique), la perméabilité des vésicules est pratiquement nulle. Cela signifie que l’échange d’eau par osmose entre l’intérieur et l’extérieur ne se fait pas et qu’il ne sera jamais possible de contrôler la tension de

ce type de membrane "rigide" de cette façon.

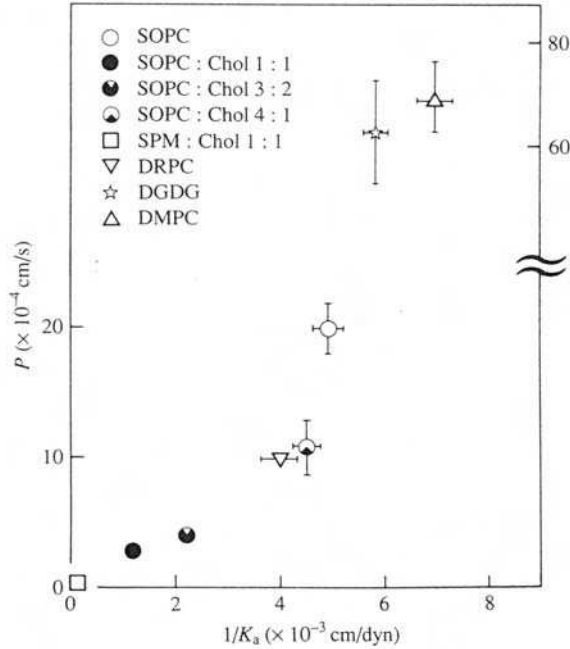


FIG. 4.19 – Perméabilité à l'eau des bicouches lipidiques en fonction de leur compressibilité de surface et pour différentes compositions. Le coefficient de perméabilité a été mesuré par dégonflement de vésicules dans une solution de sel hypertonique à tension de membrane contrôlée ($\sigma = 3 \cdot 10^{-4}$ N/m) par une pipette. D'après [Bloom et al., 1991].

B.3.4 Loi de Laplace

D'après la loi de Laplace :

$$\Delta\Pi = \Pi_i - \Pi_e = \frac{2\sigma}{R} \quad (4.9)$$

où Π_i est la pression osmotique à l'intérieur de la vésicule et Π_e celle à l'extérieur, R le rayon de la vésicule et σ sa tension de membrane. Comme les vésicules obtenues par électroformation sont relativement monodisperses, si on contrôle la différence de pression osmotique $\Delta\Pi$, on contrôle la tension σ . La dispersion en tension dans une chambre d'observation représente la dispersion en rayon de vésicules (autour de $10 \mu m$). Dans mes expériences, j'ai toujours imposé une différence de pression osmotique égale à $\Delta\Pi = 20 \text{ mOsm}$ (mesurée de façon très précise avec un osmomètre⁸) entre l'intérieur (plus concentré) et l'extérieur (moins concentré) des vésicules. De cette façon, la tension des vésicules σ_{exp} est :

$$\sigma_{exp} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ N/m} \quad (4.10)$$

B.4 Mesure de la force nécessaire pour extraire un tube

Nous avons vu au chapitre 2 (eq. 3.4) que la force nécessaire pour tirer un tube F_0 est égale à :

⁸C'est un appareil qui mesure un abaissement cryoscopique, c'est-à-dire la diminution de la température de cristallisation d'une solution en présence de solutés.

$$F_0 = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} \quad (4.11)$$

et est directement liée à la tension de membrane.

Pour vérifier que la tension que nous avons imposée en contrôlant la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule correspondait bien à nos estimations (eq. 4.10), nous avons mesuré la force F_0 nécessaire pour extraire un tube d'une vésicule, dans les mêmes conditions que nos expériences de formation de tubes de membrane. Connaissant la rigidité de courbure des vésicules, il a été possible de calculer la tension de membrane en utilisant la formule 4.11. Pour mesurer F_0 , nous avons utilisé la pince optique⁹ montée au laboratoire par D. Cuvelier et P. Nassoy [Cuvelier et al., 2005b]. Le protocole est le suivant :

- Une bille (3 μm de diamètre) recouverte de streptavidines est piégée dans la pince optique.
- La bille est mise en contact avec une vésicule qui a exactement 20 mOsm de différence de pression osmotique entre ses milieux intérieur et extérieur (voir fig. 4.20). La vésicule contenant des lipides biotinylés est recouverte de complexes streptavidine-kinésine et est sédimentée sur un réseau de MTs en présence d'ATP. Nous avons vérifié par RICM¹⁰ que la vésicule était adhérente à la surface, mais qu'aucun tube n'était tiré pour cette vésicule. En revanche, d'autres vésicules présentes dans la chambre ont formé des tubes. L'accrochage de la bille sur la vésicule rentre en compétition avec celui des complexes sur les sites biotinylés de la membrane.
- Une fois la liaison bille-membrane réalisée, la platine du microscope est reculée avec une vitesse de l'ordre de 2 $\mu m/s$. Comme la vésicule adhère à la surface de verre de la chambre d'observation solidaire de la platine (grâce aux moteurs présents au niveau de la zone de contact vésicule-MTs liés aux MTs et peut-être aussi par adhésion non spécifique), la vésicule est ainsi écartée du piège.
- Une fois la barrière de force nécessaire pour extraire le tube franchie, le tube est extrait et la force mesurée est constante, indépendamment de la longueur du tube (pour des tubes de longueur inférieure à 10 μm).

Ces observations sont en bon accord avec les courbes force-extension présentées au ch.3 §A.3.2. Ici la longueur du tube est proportionnelle au temps puisque le tube est tiré à une vitesse constante (fig. 3.7). On remarque que la taille de l'overshoot est beaucoup plus grande que les 13% attendus théoriquement si le tube était tiré de façon ponctuelle. En effet, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 3, la hauteur du maximum de force est directement liée au rayon de la zone de contact bille-vésicule [Koster et al., 2005]. Cette barrière de force est essentiellement liée à l'adhésion de la bille utilisée pour tirer le tube dans cette expérience et n'a pas lieu d'être aussi importante lorsque le tube est tiré par des kinésines.

La présence du plateau de force lorsque le tube est extrait de la vésicule illustre le fait que, une fois que le tube est tiré, la force pour le maintenir est constante

⁹voir le principe d'une pince optique développé au ch.2 §B.2.4.

¹⁰Reflection Interference Contrast Microscopy, contraste interférentiel qui permet d'observer des objets très proches de la surface de la lamelle

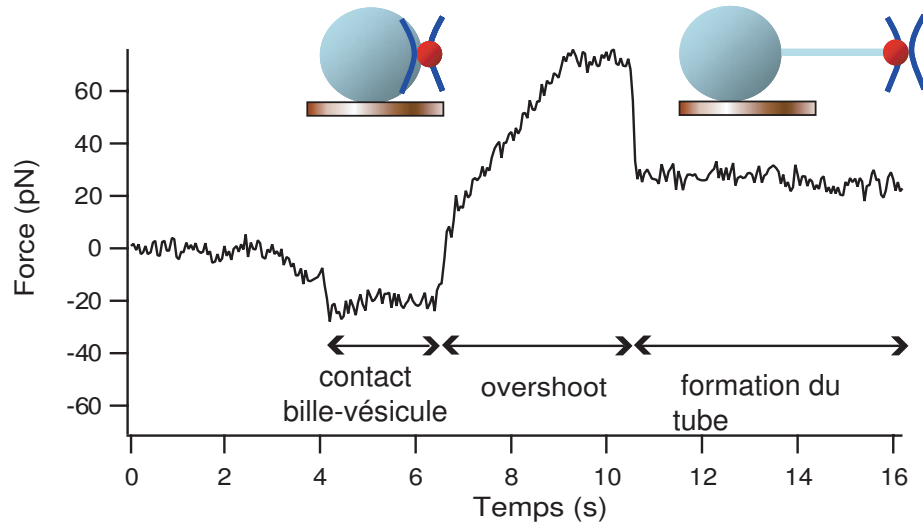


FIG. 4.20 – Courbe expérimentale montrant la force appliquée sur la membrane d’une vésicule par l’intermédiaire d’une bille piégée dans une pince optique, en fonction du temps. La bille est d’abord accrochée à la membrane en utilisant la liaison streptavidine-biotine, puis la platine du microscope est reculée, entraînant la vésicule loin du piège. Un tube de membrane est extrait de la vésicule lorsque la barrière de force est franchie. Dans des conditions expérimentales identiques à celles de nos expériences où les tubes sont tirés par des kinésines, avec une différence de pression osmotique égale à 20 mOsm entre l’intérieur et l’extérieur de la vésicule, la force nécessaire pour tirer un tube (correspondant à la valeur du plateau sur la courbe) est égale à $27,5 \pm 2,5$ pN. On remarque de plus que la force reste constante sur une longueur de l’ordre de $10 \mu\text{m}$ de tube tiré ; la variation de la tension de membrane de la vésicule est donc négligeable dans cette gamme de longueur.

pour des longueurs de tubes d’une dizaine de microns (soit environ 6 s fig. 4.20), et donc que la vésicule garde une tension constante. La force mesurée sur la courbe représentée est égale à $27,5 \pm 2,5$ pN, ce qui correspond à une tension de membrane égale à $\sigma = 2.10^{-4}$ N/m en utilisant $\kappa = 10 K_B T$ pour des vésicules contenant essentiellement de l’EPC. Cette valeur est en bon accord avec la tension initiale que nous avons imposée aux vésicules et calculée avec la loi de Laplace.

Pour finir, sachant que la vésicule n’est pas un réservoir de membrane infini et que la tension des vésicules n’est pas fixée dans ces expériences (par exemple en les aspirant dans une micropipette), on peut s’attendre à ce que, lorsqu’un tube très long est extrait, la tension de la vésicule augmente [Cuvelier et al., 2005a]¹¹. En effet, l’excès de surface stocké au départ dans les vésicules est transféré dans le tube. Pour des tubes de 10 nm de rayon (rayon correspondant à $\sigma = 2.10^{-4}$ N/m et $\kappa = 10 K_B T$), on peut calculer avec l’équation 3.13 que la force (et donc la tension de la vésicule) ne varie pas de façon significative lorsqu’un tube d’une longueur de l’ordre de $10 \mu\text{m}$ est extrait. En effet, la variation de surface correspondante est très faible.

¹¹voir ch.3 §A.3.3

Ceci correspond à des tubes de membrane qui ont poussé sur des temps pas trop longs (inférieurs à 10 minutes) quand ils sont tirés par des moteurs moléculaires. On peut aussi penser qu'il existe un réservoir de lipides dans nos vésicules, lié à leur mode de préparation, qui permet de "tamponner" la tension pendant l'extraction d'un tube, comme cela a été proposé dans [Koster et al., 2003]. Pour des temps très longs, et donc pour des réseaux de tubes de membrane très étendus, nous verrons qu'il n'est plus possible de supposer la tension constante et que d'autres phénomènes que ceux décrits par la deuxième partie du chapitre 3 apparaissent.

B.5 Contrôle de la densité surfacique initiale de moteurs sur la vésicule

Nous avons vu que pour fixer la densité de moteurs moléculaires à la surface de la vésicule, il suffit de fixer la concentration en lipides biotinylés dans la membrane (voir fig. 4.2) et de s'arranger pour avoir une kinésine par lipide biotinylé (voir la 2^{ème} partie du chapitre). Nous avons vérifié *a posteriori* que lorsque nous augmentons la quantité de lipides biotinylés dans la membrane de la vésicule, la quantité de molécules de biotine fixées par l'intermédiaire d'une streptavidine augmente de façon linéaire (voir fig. 4.21(A)). On suppose qu'il en est de même pour les kinésines biotinylées. Pour réaliser ce contrôle, nous avons procédé de la façon suivante :

1. Nous avons utilisé des vésicules qui contiennent une quantité connue de DSPE-Rhod-Biot (le lipide biotinylé qui possède aussi une rhodamine).
2. Les vésicules sont recouvertes de streptavidine non fluorescente, celle que nous utilisons pour tirer des tubes.
3. Les vésicules sont centrifugées doucement (à 30 g) de façon à enlever l'excès de streptavidine en solution
4. Les vésicules sont incubées avec un large excès de biotines-FITC fluorescentes.
5. L'excès de biotine est enlevé par centrifugation.
6. L'intensité de fluorescence des vésicules est enregistrée avec un microscope confocal, au niveau de l'équateur, à la fois dans le rouge (excitation 543 nm, émission : filtre passe-haut à 560 nm) et dans le vert (excitation à 488 nm, émission entre 505 et 530 nm). Un exemple d'images de vésicules obtenues est présenté figure 4.22(A).
7. Les intensités de fluorescence d'une vésicule sont mesurées pour les deux longueurs d'onde grâce au logiciel Métamorph. Pour calculer ces intensités, il suffit de sélectionner une couronne qui englobe le contour de la vésicule et détecter, pour chaque section de la couronne, quelle est l'intensité maximale. Les intensités maximales de tous les pixels qui constituent la circonférence de la vésicule sont ensuite sommées. On remarque figure 4.21(B), que la fluorescence d'une vésicule normalisée par son diamètre augmente bien avec la quantité de lipides biotinylés dans la membrane, à la fois dans le rouge et dans le vert.
8. Le rapport de fluorescence entre l'intensité émise dans le rouge par les lipides biotinylés, et l'intensité émise dans le vert par les biotines est ensuite placé

sur le graphique fig. 4.21(A) en fonction de la concentration fixée en lipides biotinylés dans la membrane.

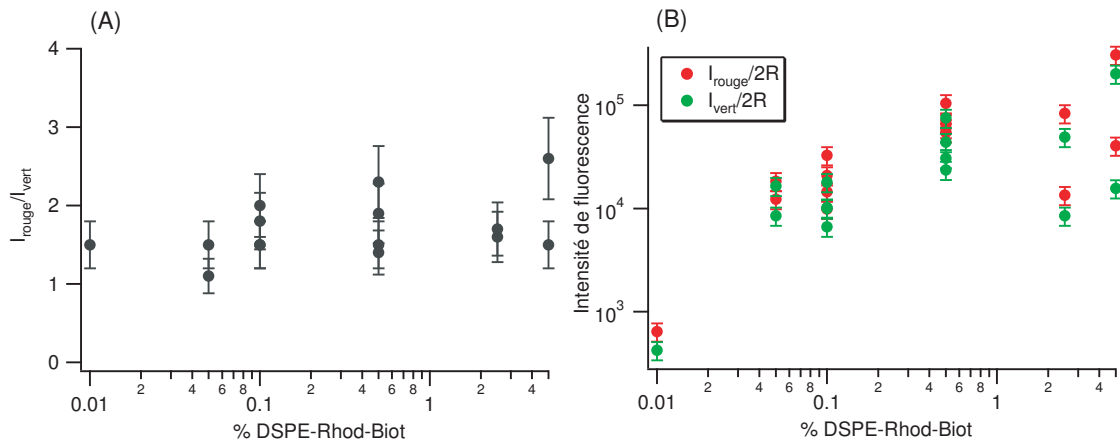


FIG. 4.21 – (A) Représentation graphique du rapport d’intensités de fluorescence émises dans le rouge (par les lipides biotinylés) et dans le vert (par les biotines-FITC) de différentes vésicules, pour différentes concentrations en lipides biotinylés rhodaminés (DSPE-Rhod-Biot). Ces rapports sont calculés à partir d’images de vésicules faites avec un microscope confocal au niveau de l’équateur de celles-ci. Les niveaux de fluorescence sont mesurés grâce au logiciel Metamorph. (B) Intensités de fluorescence des vésicules utilisées pour le (A), normalisées par le diamètre de chacune, en fonction de la concentration en lipides biotinylés.

Pour que tous les rapports soient comparables, les acquisitions faites pour chaque vésicule, dans les deux couleurs, ont été réalisées avec les mêmes paramètres du microscope confocal : (filtres, zoom, gains des photomultiplicateurs, ouverture des pinholes). Nous pouvons voir sur la figure 4.21 que le rapport des fluorescences se situe autour de 1,7 quelle que soit la concentration en lipides biotinylés supérieure à 0,01% (ce qui correspond à notre gamme de travail). Le niveau exact du rapport n’a pas d’importance puisqu’il dépend des paramètres d’acquisition gardés fixes ; ce qui est important est que ce rapport reste constant indépendamment de la quantité de lipides biotinylés présents. Ces expériences montrent donc que le nombre de molécules de biotine est directement proportionnel au nombre de lipides biotinylés dans la membrane, pour des concentrations de 0,01% à 5%. Ceci est dû à la forte affinité de la liaison streptavidine-biotine. Dans nos expériences, nous aurons un excès de complexes streptavidine-kinésine par rapport au nombre de lipides biotinylés, donc nous aurons bien un moteur par lipide biotinylé dans cette gamme de concentrations, qui correspond à notre gamme de travail. On peut remarquer cependant que pour des concentrations plus faibles en lipides biotinylés, il n’est plus possible de contrôler correctement le nombre de moteurs. En effet, nous avons observé que la streptavidine pouvait adhérer de façon non spécifique à la membrane des vésicules (et particulièrement la streptavidine fluorescente), et que cette adhésion non spécifique devient non négligeable pour des concentrations inférieures à 0,0005% de lipides biotinylés

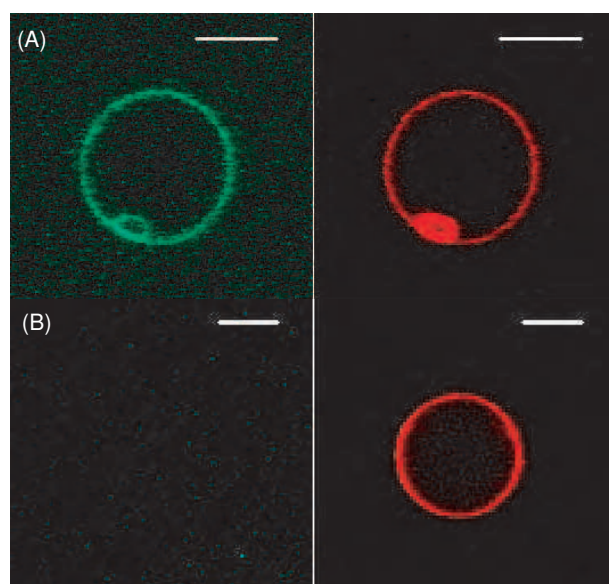


FIG. 4.22 – (A) Images d’une vésicule contenant 2,5% de lipides DSPE-Rhod-Biot, recouverte de streptavidines non-fluorescentes et de biotines-FITC. A gauche : signal obtenu dans le vert ; à droite : signal obtenu dans le rouge. (B) Contrôle : exemple d’une vésicule contenant aussi 2,5% de DSPE-Rhod-Biot mais pas de biotine-FITC à sa surface. Le signal dans le vert est négligeable. Images obtenues avec un microscope confocal Zeiss. Barre= 5 μm .

parce que les quantités de streptavidines fixées par les deux processus deviennent comparables.

Comme contrôle, nous avons fait le même rapport de fluorescence pour des vésicules qui contenaient uniquement des lipides DSPE-Rhod-Biot (sans streptavidine ni biotine-FITC), de façon à montrer que le signal obtenu dans le vert n’est pas un artéfact lié à l’émission de nos lipides rhodaminés dans le vert. Nous avons mesuré que le rapport des intensités de fluorescence rouge/vert est de l’ordre de 10 dans ce contrôle (voir figure 4.22(B)).

Nous n’avons pas utilisé de kinésines fluorescentes pour mesurer ce rapport directement, simplement parce que nous n’en avons pas à notre disposition. Nous n’avons pas non plus utilisé de streptavidine-FITC afin de se placer dans la situation la plus proche possible de nos expériences d’extraction de tubes (qui utilisent de la streptavidine non fluorescente), pour éviter de faire du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) lorsque les fluorophores sont trop proches, et enfin parce que nous avons remarqué que la streptavidine fluorescente (et particulièrement l’extravidine Cy3) peut s’attacher de façon non spécifique à la membrane. En revanche, aucun problème d’adhésion non spécifique en utilisant de la streptavidine non fluorescente et en restant dans la gamme de concentrations en lipides biotinylés utilisée n’a pu être détecté.

C Protocole pour former des tubes de membrane de façon contrôlée

Jusqu'à présent, nous avons vu le schéma de principe des expériences de formation de tubes de membrane. Nous allons maintenant détailler le protocole exact de formation des tubes, en précisant notamment quels ont été les problèmes rencontrés et la différence avec les protocoles utilisés auparavant.

C.1 Les différentes étapes du protocole de formation de tubes

La figure 4.23 schématise les différents étapes du protocole.

1. a) La première étape consiste à réaliser une chambre à flux dont la surface est recouverte d'un réseau de MTs stabilisés. Cette étape est similaire à celle décrite au paragraphe B.1.2 pour les "bead assays". Les MTs sont injectés non dilués, la période d'incubation est de l'ordre de 5 minutes. La chambre (de 10 μL environ) est ensuite rincée plusieurs fois avec de l'IMI buffer (20 μL à chaque fois), puis de la caséine à 5 mg/mL solubilisée dans du tampon IMI. La période d'incubation est de 15 minutes.
(b) Simultanément, à 4°, les kinésines sont mélangées à un large excès de streptavidine. Pour 1 tube assay, on utilise 2,5 μL de kinésines à 0,08 $\mu g/mL$ pour 2,5 μL de streptavidines non fluorescentes à 1 mg/mL. Sachant que les masses molaires des protéines sont similaires (environ 60 kDa), il y a plus de 10 fois plus de molécules de streptavidine. On peut donc supposer qu'il y a au maximum 1 kinésine par streptavidine.
2. La caséine est rincée et le mélange kinésine/ streptavidine est injecté dans la chambre qui, je le rappelle, ne contient pas d'ATP. Dans ces conditions, les moteurs se fixent aux MTs et ne se détachent plus. Cette étape est réalisée à température ambiante ($T=20^\circ$, dans une pièce climatisée). Le temps d'incubation est de l'ordre de 10 minutes de façon à ce que les kinésines aient le temps de s'attacher sur les MTs et de les saturer.
3. La chambre est rincée plusieurs fois au tampon IMI. Cette étape cruciale permet de retirer de la chambre le large excès de streptavidine en solution, ainsi que tous les moteurs détériorés qui ne pouvaient pas s'accrocher aux MTs. A la fin de cette étape, les MTs sont recouverts de kinésines, qui portent toutes une streptavidine. La densité de MTs va alors fixer le nombre de kinésines qui retournera en solution après injection d'ATP. Il est donc important de travailler avec une haute densité surfacique de MTs stabilisés pour avoir suffisamment de moteurs.
4. La chambre est rincée au "motility buffer" MB 1X puis 1 μL de vésicules issues de la chambre de pousse (voir §A.4.1) est injecté. Les complexes kinésine-streptavidine se décrochent des MTs en présence d'ATP, et diffusent dans la solution jusqu'aux sites d'accrochage des vésicules. Le large excès du nombre de

kinésines présentes par rapport au nombre de sites d'accrochage¹² nous permet de penser que ces sites sont rapidement occupés par des kinésines (en moins d'une minute) et que la diffusion n'est pas limitante. Cette saturation des sites d'accrochage a été vérifiée expérimentalement (voir fig. 4.24). On peut noter que pour des densités de lipides biotinylés plus importantes, 1% par exemple, la saturation n'est obtenue qu'après plusieurs heures.

5. La chambre est scellée, de façon à limiter l'évaporation du milieu et la dissolution d'oxygène dans le tampon, puis posée sur un vidéomicroscope et immédiatement observée de façon à pouvoir voir les vésicules sédimenter et les tubes se former. Loin du seuil de formation des tubes, ceux-ci apparaissent de façon presque immédiate (quelques minutes après injection, le temps de faire les réglages du microscope). Un exemple d'image de réseau de tubes de membrane obtenue en DIC est représenté figure 4.25.

Les étapes les plus importantes de ce protocole consistent tout d'abord à utiliser un large excès de streptavidine par rapport aux kinésines, de façon à avoir au maximum une streptavidine par kinésine. Ensuite, le fait de pouvoir rincer la streptavidine en excès et d'injecter un nombre de sites d'accrochage sur les vésicules beaucoup plus petit que le nombre de complexes kinésine-streptavidine présents, permet d'affirmer que l'ensemble des sites biotinylés de la membrane est occupé. On peut donc supposer qu'il y a **une kinésine par lipide biotinylé dans la membrane**. Le défaut majeur, en revanche, est qu'il n'est pas possible de travailler avec une concentration en lipides biotinylés supérieure à 0,1% dans la membrane, car sinon, le temps de saturation des sites de la vésicule (voir fig. 4.24) est supérieur au temps nécessaire pour observer la formation des tubes de membrane. Ainsi, la concentration surfacique de moteurs ne serait pas contrôlée et serait surtout non constante dans le temps.

Pour qu'il soit possible de filmer la dynamique de formation des tubes, il est essentiel d'ajouter au MB (motility buffer) un "cocktail" qui limite le photoblanchiment en augmentant un peu le temps de vie des fluorophores (d'un facteur 3 environ dans nos conditions expérimentales). Nous avons vu en effet au paragraphe §B.2.1 que l'éclairement des fluorophores les dégradait en créant des radicaux libres qui sont très nocifs pour tout ce qui se trouve à proximité, en particulier les kinésines. Si rien n'est présent en solution pour réagir avec ces radicaux libres, les kinésines sont dégradées avant d'avoir pu tirer un tube. C'est cet effet antioxydant qui est capital pour nos expériences, plus que l'augmentation du temps de vie des fluorophores.

¹²Prenons en moyenne 50 vésicules de 10 μm de rayon par chambre, avec au maximum 0,1% de leur surface occupée par des lipides biotinylés. Sachant que la surface occupée par un lipide est environ 0,5 nm^2 , il y a $2,5 \cdot 10^7$ sites d'accrochage. Or, nous avons injecté 2,5 μL de kinésines à environ 1 μM , soit $2,5 \cdot 10^{11}$ molécules, nombre très grand devant le nombre de sites d'accrochage, même si on en perd un peu au moment du rinçage.

C. Protocole pour former des tubes de membrane de façon contrôlée

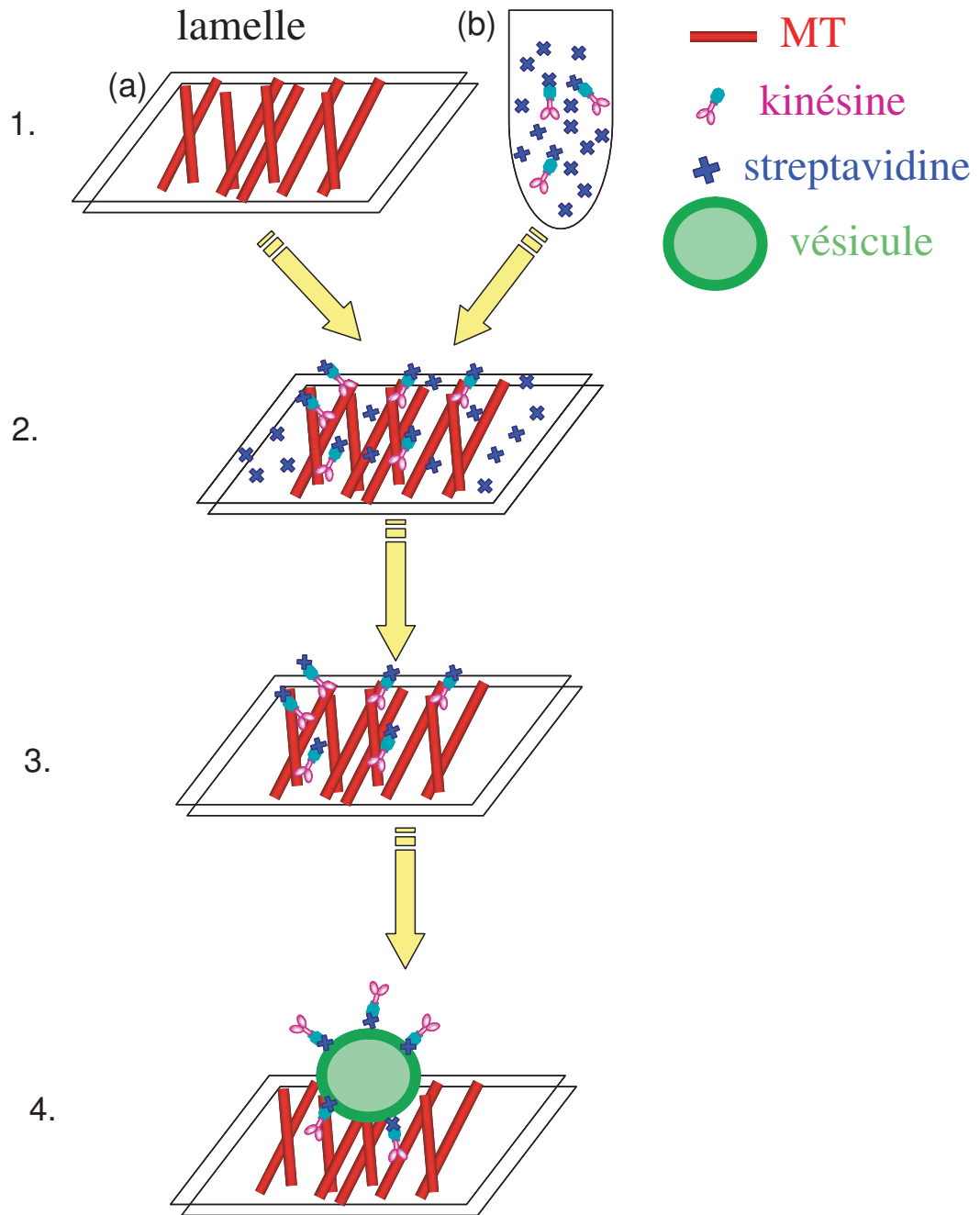


FIG. 4.23 – Les différentes étapes du protocole de formation de tubes de membrane. (1) La lamelle de la chambre d’observation est recouverte de MTs d’une part, les kinésines sont incubées avec un large excès de streptavidine d’autre part. (2) Les complexes streptavidine-kinésine sont injectés dans la chambre d’observation (incubation 10 min). (3) La chambre est rincée de façon à enlever la streptavidine libre et les moteurs qui ne peuvent pas s’attacher. (4) La chambre est rincée avec de l’ATP et les vésicules sont injectées. Les kinésines se détachent des MTs et vont s’accrocher par diffusion sur les vésicules.

Chapitre 4. Comment contrôler les paramètres physiques et biochimiques pertinents dans le système minimal *in vitro*

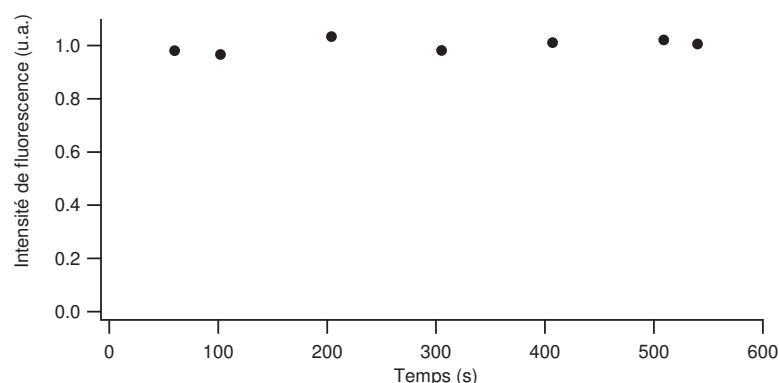


FIG. 4.24 – Intensité de fluorescence d'une vésicule contenant 0,1% de lipides biotinylés non fluorescents en fonction du temps. A $t=0$, la vésicule est injectée dans une chambre qui contient des kinésines attachées à de la streptavidine fluorescente (Alexa-488) en solution avec de l'ATP ou bien marchant le long de MTs (étape 4 du protocole). Les complexes kinésine-streptavidine-alexa atteignent la vésicule par diffusion. On remarque qu'après 60 s, le temps nécessaire pour régler le microscope, l'intensité de fluorescence de la vésicule est saturée. Ceci signifie qu'il faut moins de 60 s aux complexes kinésine-streptavidine pour saturer les sites d'accrochage d'une vésicule. Les images ont été obtenues avec un microscope confocal.

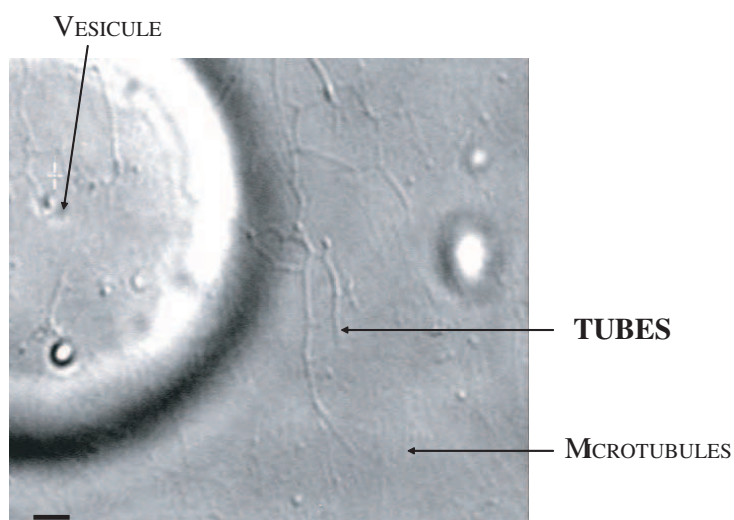


FIG. 4.25 – Image d'un réseau de tubes de membrane tiré à partir d'une vésicule par des kinésines le long d'un réseau de MTs obtenue en DIC. Barre= $2 \mu m$.

- Le "cocktail" ("oxygen scavenger") utilisé contient :
- 0,18 mg/mL de catalase (Calbiochem)
 - 0,37 mg/mL de glucose oxydase (Calbiochem)
 - 50 mM de glucose (Sigma)
 - 5 mM de DTT (Polyscience)

C.2 Une journée d'expériences pour faire des tubes de membrane

1. Le matin, il faut préparer :

- Le tampon IMI + 5 mM DTT + 20 μ M taxol pour les ringages.
- Le motility buffer 1X : MB = IMI + 1 mM ATP + 5 mM DTT + 20 μ M taxol + 50 mM glucose, avec une différence de pression osmotique contrôlée, égale à celle du sucrose présent dans les vésicules moins 20 mOsm.
- Dégeler un aliquot de streptavidine qui se conserve à -20°. Chaque aliquot ne se garde qu'une journée, si l'on veut garder les protéines fonctionnelles.
- Dégeler un aliquot d'"oxygen scavenger" 20X (mélange catalase+glucose oxydase) stocké à -20°.
- Dégeler un aliquot de caséine stocké à -20°.
- Dégeler un aliquot de kinésine stocké dans l'azote liquide.
- Sortir les vésicules du frigidaire.
- Faire des microtubules

Le glucose se garde à 4°. Les aliquots de stocks de taxol (10 mM dans DMSO), ATP (100 mM dans IMI), DTT (1,25 mM) sont stockés à -20°.

2. Après ces 2h de préparation les expériences peuvent commencer.

3. Pour chaque "tube assay", avant la dernière injection de motility buffer (étape 4), il faut ajouter au dernier moment 1 μ L d'"oxygen scavenger" 20X pour 19 μ L de MB prêt à être injecté de façon à ce qu'il soit actif lors des expériences.

4. Un aliquot de kinésines permet de faire 4 "tube assays". Il est donc approprié de faire un multiple de 4 expériences dans une journée. A la fin de la journée, il est préférable de jeter tous les aliquots non terminés (streptavidine, "oxygen scavenger", IMI, MB etc.) de façon à avoir toujours des produits frais.

C.3 Comparaison avec les protocoles plus anciens

C.3.1 Protocole de A. Roux et al.

Brièvement, le protocole de A. Roux et al. [Roux et al., 2002] consistait à :

1. préincuber les kinésines avec un large excès de billes recouvertes de streptavidines (0,12 μ m).
2. préparer une chambre à flux avec une lamelle recouverte d'un tapis de MTs stabilisés (cette étape est similaire quels que soient les protocoles utilisés), passivée avec de la caséine
3. mélanger les billes recouvertes de kinésines avec du "motility buffer" et injecter le tout dans la chambre. à flux, en ajoutant pour finir quelques μ L de vésicules biotinylées.

Chronologiquement, c'est le premier protocole qui a permis d'obtenir des tubes de membrane. Ils ont ainsi réussi à tirer des tubes de membrane. L'inconvénient

majeur, cependant, est qu'il n'est pas possible de retirer les moteurs inactifs qui ne s'accrochent pas aux MTs. Comme ces moteurs ne peuvent pas participer au tirage des tubes mais occupent des sites, ils diminuent l'efficacité du système. De plus, comme il est impossible de savoir exactement combien de moteurs sont accrochés sur les billes, combien de billes tirent, s'il n'y a pas compétition entre les billes recouvertes de kinésines et de la streptavidine libre présente dans la solution des billes (celle-ci provient de la désorption de la streptavidine des billes), et qui permettrait d'attacher les moteurs directement à la surface des vésicules, il est impossible de faire une étude quantitative des étapes de formation et de croissance de tubes de membrane. On peut remarquer enfin que dans [Roux et al., 2002], un des points clés de l'article mentionnait qu'il ne semblait pas possible de tirer des tubes sans bille. Le protocole utilisé pour tirer cette conclusion était proche de celui présenté au paragraphe précédent, à ceci près que la densité de MTs était beaucoup plus faible. Il y avait donc beaucoup moins de kinésines en solution après injection d'ATP. De plus, l'absence de "cocktail antioxydant" dans le motility buffer réduisait encore de beaucoup la quantité de kinésines actives car ces dernières étaient rapidement oxydées par l'oxygène présent en solution ou par les radicaux libres créés par l'observation même des vésicules. On peut donc penser que, d'une façon ou d'une autre, le nombre de moteurs actifs présents à la surface de la vésicule n'était pas suffisant pour extraire un tube, c'est-à-dire en dessous de la concentration surfacique minimale décrite au chapitre 3 §B.3.5.

C.3.2 Protocole de G. Koster et al.

Dans le protocole de Koster et al. [Koster et al., 2003], une chambre à flux recouvertes de MTs est aussi préparée. Les vésicules biotinylées sont préincubées avec un large excès de streptavidine, de façon à occuper les sites d'accrochage des vésicules. Les vésicules recouvertes de streptavidine sont ensuite mélangées avec des kinésines et du "motility buffer" contenant un "cocktail" antiphotoblanchiment, et le tout est injecté dans la chambre d'observation. Les moteurs s'attachent directement à la membrane et tirent des tubes le long de MTs. Koster et al. ont donc montré qu'il était possible de tirer des tubes de membrane sans utiliser de billes comme intermédiaires entre les kinésines et la membrane.

Là encore, les moteurs inactifs ne sont pas retirés de la solution. De plus, comme la solution contient des streptavidines libres, des biotines et des kinésines biotinylées, il n'est pas possible de savoir dans quelle mesure les sites d'accrochage de moteurs sur les vésicules sont occupés (par des biotines ou des kinésines), et donc de connaître la densité surfacique de moteurs. Aucune étude quantitative des étapes de formation des tubes n'était alors envisageable. Ils ont cependant montré qualitativement qu'il y a un seuil en nombre de moteurs en dessous duquel il n'y a plus aucun tube de membrane formé. Ils ont aussi montré que lorsque la tension des vésicules est très faible (par exemple quand des pores ont été formés dans la membrane par de la streptolysine O), il est plus facile d'extraire des tubes du fait de la diminution de la force nécessaire pour extraire les tubes.

Conclusion

On comprend que la plus grande difficulté de mon travail consistait à contrôler de façon quantitative l'ensemble des paramètres impliqués dans la formation et la croissance de tubes, et notamment la concentration de moteurs à la surface des vésicules et la tension de membrane. Ce travail s'est inscrit dans la continuité des travaux de A. Roux et al. qui ont montré qu'il était possible de former des tubes de membrane avec un nombre minimal de composants, et de Koster et al. qui ont montré qualitativement l'influence de certains de ces paramètres. Nous allons maintenant étudier les résultats obtenus grâce à ce nouveau protocole pour former des tubes de membrane.

Chapitre 4. Comment contrôler les paramètres physiques et
biochimiques pertinents dans le système minimal *in vitro*

Chapitre 5

Etude expérimentale de l'extraction et de la croissance de tubes de membrane : Comparaison avec la théorie

La chapitre précédent a permis d'introduire des composants impliqués dans le système minimal permettant de tirer des tubes de membrane à partir de vésicules par des kinésines le long de MTs. Nous avons vu qu'il était possible de connaître, mesurer et contrôler les principales propriétés physiques et biochimiques qui caractérisent ces composants. Nous allons maintenant montrer quelles sont les propriétés importantes qu'il est possible de mettre en évidence à partir de ce système. Nous verrons dans un premier temps qu'il est possible, en faisant varier indépendamment la tension de membrane et la densité de moteurs à la surface de la vésicule, de comprendre les conditions de formation et d'existence d'un tube de membrane (étude aux temps courts). Nous verrons dans un deuxième temps qu'il est possible d'étudier de façon quantitative la dynamique de répartition des moteurs moléculaires le long d'un tube, une fois que celui-ci est formé (étude aux temps longs). Les différentes observations expérimentales présentées seront confrontées aux résultats obtenus par l'analyse théorique en champ moyen présentée au chapitre 3 §B, ce qui permettra de caractériser des paramètres moléculaires liés à la dynamique des moteurs moléculaires. Les résultats obtenus seront de plus mis en parallèle avec des simulations effectuées par Otger Campàs, du groupe de théorie de l'Institut Curie, faisant suite à l'analyse théorique. Ces premiers résultats permettront de rendre en partie compte du rôle des fluctuations dans le trafic de moteurs moléculaires lors de l'extraction d'un tube de membrane. Nous verrons finalement une description qualitative de la dynamique des tubes aux temps très longs, pour des réseaux de tubes denses. Dans le cas des tubes très longs où la variation de la force devient importante, ces résultats seront interprétés grâce à un prolongement récent de la théorie présentée au chapitre 3.

A Choix des paramètres suivant le type d'étude

Nous avons vu au chapitre 3 dans la partie théorie (§B), qu'on peut distinguer deux types de comportements intéressants pour les tubes de membrane :

- **le comportement aux temps courts**, dont l'étude consiste à déterminer, pour une certaine tension de la vésicule, la concentration surfacique minimale de moteurs à la surface de la vésicule qui permet d'extraire des tubes.
- **le comportement aux temps longs**, dont l'étude consiste à caractériser la dynamique de répartition des moteurs moléculaires le long d'un tube de membrane en train d'être tiré. Les études doivent être réalisées pour des tubes pas trop longs (de l'ordre de $10 \mu m$), où l'on peut considérer que la force nécessaire pour maintenir le tube F_0 est constante.

A.1 Choix des lipides biotinylés

Suivant le type de comportement étudié, le choix des lipides biotinylés a été différent.

L'étude **aux temps courts** de la détermination de la concentration surfacique minimum en moteurs moléculaires se fait en utilisant un lipide biotinylé non fluorescent. Les expériences consistent à diminuer progressivement la concentration en lipides biotinylés jusqu'à ne plus observer aucun tube de membrane. La membrane est alors marquée en fluorescence par un lipide fluorescent (DHPE-TRITC, ou DHPE-Texas Red), de façon à pouvoir "guetter" les tubes de membrane par vidéomicroscopie. En général, les mesures de seuils ont été effectuées avec du DOPE-Cap-Biot. A titre de contrôle, nous avons utilisé comme lipides biotinylés du DSPE-PEG₂₀₀₀-Biot, utilisé avec 4,5 % de DSPE-PEG₂₀₀₀ (sans biotine) dans la membrane, de façon à limiter l'adhésion non spécifique des complexes streptavidine-kinésine sur la membrane. Ces expériences ont permis de vérifier que la concentration minimale en moteurs (et donc en lipides biotinylés) mesurée est la même que dans le cas où de simples lipides biotinylés sont utilisés (DOPE-Cap-Biot). Cela signifie alors que l'adhésion non spécifique de moteurs à la surface de la membrane est négligeable.

L'étude **aux temps longs** de la caractérisation de la distribution des moteurs moléculaires le long d'un tube de membrane a été réalisée grâce au DHPE-Rhod-Biot, qui permet de marquer en fluorescence les sites (biotinylés) d'accrochage des moteurs, et donc marquer la position des moteurs. Toutes les études ont été faites avec des vésicules 99,9% EPC/0,1%DSPE-Rhod-Biot (en nombre de lipides). Les expériences de contrôle, réalisées avec un marquage non spécifique des sites d'accrochage des moteurs ont été réalisées en utilisant des vésicules 98,9% EPC/0,1%DOPE-Cap-Biot avec en plus 1% de lipides fluorescents (DHPE-TRITC ou DHPE-Texas Red) dans la membrane. L'étude aux temps longs a aussi été réalisée sur des vésicules rigides (moitié SM/moitié cholestérol) contenant 0,1% de DSPE-Rhod-Biot. Un bilan récapitulatif des différentes compositions utilisées est représenté dans le tableau 5.1.

A. Choix des paramètres suivant le type d'étude

| Lipides de base | Lipides biotinylés | Lipides fluo. | Utilisation |
|-----------------|--------------------|---------------|--|
| EPC | ≠ % DOPE-Cap-Biot | 1% | Etude aux temps courts Détermination du seuil ρ_{∞}^{min} |
| EPC | ≠ % DSPE-PEG-Biot | 1% | Etude de l'influence de l'adhésion non spécifique |
| SM/Chol | ≠ % DOPE-Cap-Biot | 1% | Vésicules rigides |
| SM/Chol | ≠ % DSPE-PEG-Biot | 1% | Vésicules rigides |
| 99,9% EPC | 0,1%DSPE-Biot-Rhod | - | Etude aux temps longs Dynamique des kinésines |
| 98,9% EPC | 0,1%DOPE-Cap-Biot | 1% | Contrôle, marquage non spécifique de la membrane |
| 99,9% SM/Chol | 0,1%DSPE-Biot-Rhod | - | Etude aux temps longs Vésicules rigides |

TAB. 5.1 – Récapitulatif des différentes compositions de vésicules utilisées pour les études de tube de membranes aux temps courts et aux temps longs. Dans le cas des temps courts, le pourcentage de lipides biotinylés a été varié de 0.005% à 0,1%.

A.2 Choix de la tension de membrane

Nous avons vu que la tension de membrane de la vésicule est fixée par la différence de pression osmotique appliquée entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. Cette différence a été fixée dans toutes les expériences (sauf mention contraire) égale à $\Pi_i - \Pi_e = 20$ mOsm, de façon à avoir des vésicules tendues ($\sigma \simeq 2.10^{-4}$ N/m). Deux raisons nous ont poussés à utiliser des vésicules aussi tendues.

Tout d'abord, comme la tension détermine la force nécessaire pour tirer un tube $F_0 = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma}$ (avec une rigidité de courbure fixée, égale à celle des vésicules EPC), plus la tension est élevée, plus il est difficile d'extraire des tubes. Ainsi, à haute tension, le nombre de tubes tirés est typiquement de l'ordre de deux (un de chaque côté de la vésicule), ce qui facilite l'analyse de la distribution de moteurs le long du tube. Le fait qu'il y ait très peu de tubes tirés permet aussi de supposer que la tension de la membrane varie peu, et que donc **la force nécessaire pour tirer le**

tube ne varie pas de façon significative pour des longueurs de tube de l'ordre de $10 \mu\text{m}$. C'est ce que nous avons remarqué sur la courbe de force présentée au ch.4 figure 4.20. En effet, nous avons vu dans le chapitre 3 que, lorsque des tubes longs (ou de façon équivalente beaucoup de tubes) sont tirés d'une seule vésicule dont la tension n'est pas contrôlée, celle-ci augmente lentement avec la longueur du tube puisqu'une partie de l'excès de surface stocké au niveau de la vésicule déterminant la tension (voir eq. 2.15) est transmise dans le tube [Cuvelier et al., 2005a]. Pour des tubes tirés très longs (de l'ordre de $100 \mu\text{m}$, aux temps très longs) ou pour un grand nombre de tubes tirés, la force F_0 n'est plus constante et dépend de la longueur du tube. L'influence de cet effet sera étudiée dans la dernière partie de ce chapitre.

La deuxième raison vient du fait que plus la tension est élevée, plus le nombre de moteurs qui tirent au seuil $n_b^S = F_0 a / 2K_B T$ (voir eq. 3.45) est élevé. Pour des tensions faibles de membrane (typiquement 10^{-7} N/m pour des vésicules fluctuantes), ce nombre de moteurs doit être de l'ordre de 1, puisque $F_0 \simeq 3$ pN. La densité de moteurs sur la surface serait alors de $5 \cdot 10^{-6}$ %. Notre système expérimental ne serait pas alors assez précis pour être sensible à des valeurs aussi faibles. En effet, nous avons notamment vu qu'il y a toujours une petite part d'adhésion non spécifique de streptavidines (liées à des kinésines) à la surface des vésicules. Pour des faibles tensions, cette adhésion non spécifique de moteurs à la surface est suffisante pour extraire des tubes. Il n'est donc pas possible de contrôler la densité surfacique de moteurs ρ_∞ de façon suffisamment précise pour voir des effets au niveau du seuil en ρ_∞ . Une tension de membrane élevée permet de **négliger les effets de l'adhésion non spécifique** car la concentration en molécules adsorbées non spécifiquement devient négligeable devant celle des moteurs attachés spécifiquement.

La figure 5.1 illustre le fait que, lorsque la vésicule est tendue, seuls un ou deux tubes sont tirés de la vésicule selon le protocole présenté au ch.4 §C. En revanche, quand la vésicule est fluctuante au départ, le réseau de tubes peut devenir vraiment très dense, étant donnée la densité du réseau de MT. Pour diminuer le nombre de tubes tirés, il était justement possible de jouer aussi sur la densité du réseau de MTs. Avec un réseau très peu dense, et des MTs bien alignés (grâce au flux d'injection), il est aussi possible d'avoir uniquement un ou deux tubes tirés. Cependant, nous n'avons pas retenu cette méthode puisque le nombre de MTs présents dans la chambre détermine la quantité de kinésines fixées (voir étape 3 dans le protocole figure 4.23). Si le nombre de MTs est réduit, la capacité de stockage des kinésines est réduite d'autant. Alors, en présence d'ATP lorsque les kinésines se détachent et passent en solution, la concentration en kinésines dans la chambre est plus faible. Le temps de diffusion nécessaire pour atteindre les sites d'accrochage biotinylés de la vésicule augmente beaucoup. Il faut plus de temps pour saturer les sites d'accrochage de la vésicule (jusqu'à plusieurs heures), et les tubes de membrane peuvent être extraits avant que la saturation ne soit terminée. La concentration surfacique de moteurs n'est donc plus contrôlée lors de l'extraction de ces tubes et aucune analyse quantitative du phénomène n'est possible.

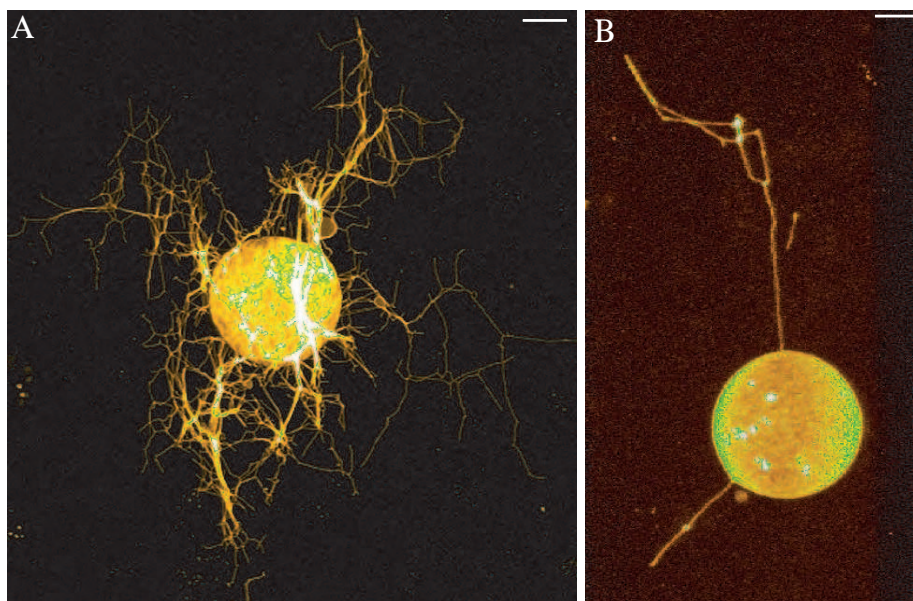


FIG. 5.1 – Réseaux de tubes de membrane tirés par des kinésines. (A) Réseau dense obtenu à partir d'une vésicule dont la tension de membrane initiale est faible (de l'ordre de 10^{-6} N/m). Barre= $10 \mu m$. (B) Réseau de tubes obtenu pour une densité comparable de MTs mais avec une vésicule initialement tendue ($\sigma = 2 \cdot 10^{-4}$ N/m. Barre= $5 \mu m$). Les images ont été obtenues par microscopie confocale. Ces sont des projections sur le plan contenant les tubes d'une série d'images obtenues dans la direction perpendiculaire à ce plan. Cette façon de projeter permet de mieux se rendre compte de la forme de la vésicule. Dans ces deux cas, les sites s'accrochage des moteurs n'étaient pas marqués de façon spécifique. La membrane était marquée de façon uniforme avec du DHPE-TRITC.

B Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane

Dans la partie théorie, les temps courts avaient été définis comme les temps inférieurs aux minimums de k_u^0 et k_b , les taux de détachement à force nulle du MT et d'attachement sur le MT respectivement. A cette échelle de temps, il n'y a pas d'événement d'attachement ou de détachement donc les densités de moteurs liés et non liés au MT gardent leur valeur initiale. La limite des temps courts est de l'ordre de 0,1 s ; ce qui signifie que toute l'étude présentée au chapitre 3 sur les temps courts ne s'applique que pour décrire l'extraction d'un tube. Dès que le tube existe et commence à pousser, on peut considérer que la période correspond aux temps longs.

B.1 Seuils d'extraction d'un tube de membrane

Pour déterminer un seuil d'extraction d'un tube, le critère d'observation est simple : soit il y a des tubes, soit il n'y en a pas. S'il y en a, cela signifie que l'on se trouve dans un domaine de l'espace des phases où les tubes existent et sont stables. S'il n'y en a pas, même au bout de 3h d'attente, cela signifie que l'on se trouve dans la zone où aucun tube ne peut exister (voir les diagrammes de phase figures 3.18 et 3.19 dans la partie théorie). Nous avons vu qu'il y a essentiellement deux paramètres importants qui vont déterminer si les tubes peuvent exister ou non lors d'un "tube assay" (expérience dont le protocole a été présenté ch.4 C) :

1. la tension de membrane σ
2. la concentration surfacique de moteurs à la surface de la vésicule ρ_∞

et qu'il était possible de contrôler chacune indépendamment l'une de l'autre. Nous allons maintenant voir pour quelles valeurs de ces paramètres il est possible d'obtenir des tubes. Bien entendu, comme il peut y avoir des petites fluctuations dans la fixation de ces paramètres, il est préférable de tester plusieurs fois un couple de valeurs. Lorsque les paramètres sont choisis de telle façon qu'on se trouve juste au seuil de formation des tubes de membrane, on observe juste un ou deux très petits tubes dans une chambre d'observation, contenant une cinquantaine de vésicules. Ce critère est un petit peu plus difficile à appliquer de façon systématique et équivalente dans toutes les expériences, d'où l'importance, encore une fois, de les recommencer plusieurs fois.

B.1.1 Seuil en tension de membrane pour une concentration surfacique de moteurs donnée

Lorsque la concentration surfacique de moteurs est fixée, et que des "tubes assays" sont effectués pour différentes valeurs de la tension de membrane, nous avons remarqué que :

- pour des **vésicules fluctuantes**, obtenues en imposant une pression osmotique à l'intérieur de vésicule inférieure à celle à l'extérieur ($\Pi_i < \Pi_e$, voir figure 4.18), beaucoup de tubes sont extraits des vésicules. Pour des faibles tensions initiales (inférieur à 10^{-7} N/m), on se trouve clairement dans le domaine d'**existence des tubes de membrane**. Un exemple de réseau de tubes obtenu dans ce cas a déjà été présenté figure 5.1(A).
- en augmentant progressivement la tension de membrane, on observe qu'il existe une **tension maximale** au-delà de laquelle aucun tube n'existe plus. Cette tension dépend bien sûr de la concentration surfacique de moteurs choisie.

Il existe donc un **seuil en tension de membrane pour une concentration surfacique de moteurs donnée**. De plus, on peut remarquer que, au seuil en tension, beaucoup de vésicules sont à la limite de former des tubes, c'est-à-dire qu'elles sont très déformées mais qu'aucun tube n'est extrait. Cette forme limite ressemble beaucoup à un citron, et est typique de la forme des vésicules près du seuil. Un exemple de "citron" est représenté figure 5.2.

B. Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane

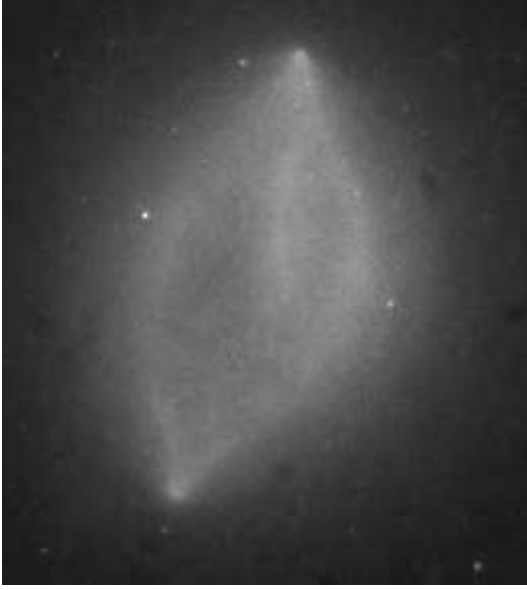


FIG. 5.2 – Image d’une vésicule contenant des lipides fluorescents, dont la tension de membrane et la densité surfacique sont telles que le nombre de moteurs présents à la surface est juste inférieur au nombre minimum pour extraire un tube. La vésicule prend alors une force de citron mais aucun tube n’est extrait. Image obtenue en videomicroscopie. Barre=5 μm .

Prenons un exemple quantitatif : on fixe ρ_∞ en utilisant une concentration de 0,01% de lipides biotinylés dans la membrane. Sachant que la surface d’un lipide est de l’ordre de $0,5 \text{ nm}^2$ et qu’il y a un moteur par lipide biotinylé, la densité surfacique de moteurs est égale à $10^{-4}/0,5 \cdot 10^{-18} = 200 \text{ moteurs}/\mu\text{m}^2$. Pour des vésicules très tendues ($\Delta\Pi = 40 \text{ mOsm}$, donc $\sigma \simeq 5 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$), aucun tube n’a jamais pu être observé, et pour des vésicules fluctuantes ($\sigma \simeq 10^{-7} \text{ N/m}$) beaucoup de tubes ont été observés. La tension seuil se trouve donc entre ces deux valeurs, et nous avons montré qu’elle est de l’ordre de $\sigma = 2 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$ ($\Delta\Pi = 20 \text{ mOsm}$). L’autre possibilité consiste à fixer la tension de membrane et faire varier ρ_∞ . C’est ce qui est décrit au paragraphe suivant.

B.1.2 Seuil en concentration surfacique de moteurs pour une tension de membrane donnée

Il est plus facile de fixer σ et de faire varier ρ_∞ que l’inverse, puisque la gamme de tensions accessibles en contrôlant la pression osmotique est moins étendue que la gamme de concentrations accessibles en jouant sur la concentration en lipides biotinylés. On peut faire varier $\Delta P_i = \Pi_i - \Pi_e$ entre 4 et 40 mOsm, ce qui permet de faire varier la tension entre $5 \cdot 10^{-5}$ à $5 \cdot 10^{-4} \text{ N/m}$. En dessous de 4 mOsm, la tension de membrane imposée est de l’ordre de la tension de membrane initiale des vésicules obtenues par électroformation ; l’effet de pression osmotique est donc masqué. Au-delà de 40 mOsm, la tension de membrane des vésicules est suffisamment élevée pour que les vésicules relâchent leur contrainte de tension en ouvrant des pores [Sandre et al., 1999]. Les vésicules perdent alors une partie de leur volume à travers le pore, tout en gardant la même surface (le même nombre de lipides), la tension de membrane diminue donc par rapport à la tension imposée par la différence de pression osmotique. Il est donc possible de **varier la tension de membrane, de façon quantitative, sur une décade** alors que la **concentration en lipides**

biotinylés peut être variée sur au moins trois décades : de 0,0005% à 0,5%. Nous avons déjà vu que la limite inférieure est fixée par la compétition avec l'adhésion non spécifique de complexes streptavidine-kinésine, alors que la limite supérieure est fixée par le temps de diffusion des moteurs.

Lorsque la tension de membrane est fixée à 2.10^{-4} N/m en imposant une différence de pression osmotique égale à 20 mOsm (et $\kappa=10 K_B T$ pour les vésicules EPC), et que l'on augmente progressivement la concentration en lipides biotinylés dans les vésicules lors de "tube assays" successifs, on observe les deux régimes représentés figure 5.3.

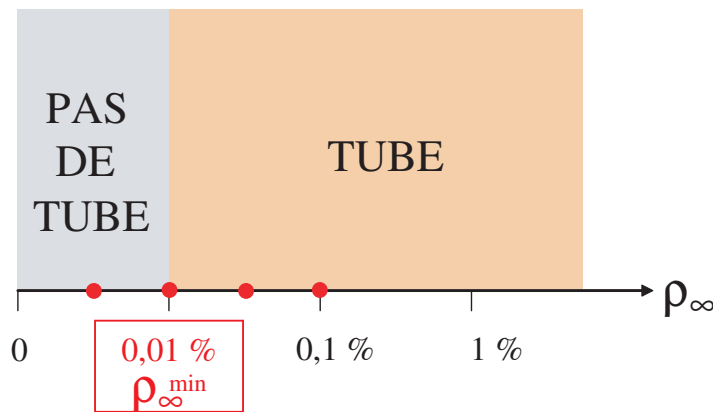


FIG. 5.3 – Diagramme montrant les régimes d'existence de tubes de membrane, pour $\sigma=2.10^{-4}$ N/m et $\kappa=10 K_B T$. La concentration surfacique minimale en moteurs mesurée pour observer des tubes de membrane est égale à $\rho_\infty^{min}=0,01$ % de la surface totale, soit 200 moteurs/ μm^2 . Les points rouges correspondent aux concentrations testées expérimentalement.

On a observé qu'il existait un **seuil en concentration surfacique de moteurs pour une tension de membrane donnée**. On a mesuré la concentration surfacique de moteurs minimale en dessous de laquelle aucun tube n'a pu être observé. Ce seuil est égal à 0,01% de lipides biotinylés dans la membrane. Si on suppose que tous les lipides occupent la même surface égale à $0,5 \text{ nm}^2$, alors $\rho_\infty^{min} = 200 \text{ moteurs}/\mu m^2$. De plus, on a observé qu'à 0,005%, aucun tube n'est tiré. On a donc :

$$\boxed{\rho_\infty^{min,exp} = 200 \pm 100 \text{ moteurs}/\mu m^2} \quad (5.1)$$

Il a été en pratique difficile de déterminer d'autres couples $(\sigma, \rho_\infty^{min})$ au seuil, pour les raisons énoncées précédemment. On remarque de plus que les deux approches décrites pour caractériser le seuil de formation de tubes de membrane sont en théorie équivalentes, mais en pratique, la seconde méthode est plus précise que la première. On observe dans tous les cas que la tension de membrane et la concentration surfacique de moteurs jouent le même rôle dans la formation des tubes de membrane. La tension détermine la force F_0 (et donc le nombre de moteurs au seuil) nécessaire

B. Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane

pour extraire le tube (avec un κ fixé), alors que ρ_∞ détermine l'échelle du nombre de moteurs qui tirent le tube.

B.1.3 Comparaison avec la théorie

Les observations décrites précédemment sont en bon accord avec l'analyse théorique présentée au chapitre 3, qui montrait aussi que σ et ρ_∞ jouaient le même rôle dans la formation d'un tube de membrane puisque que le paramètre important qui caractérise le seuil (ν) varie comme la racine carrée de σ/ρ_∞ . Il est possible de comparer le seuil expérimental obtenu pour ρ_∞ avec le seuil prévu par la théorie (eq. 3.41) :

$$\rho_\infty^S \equiv \frac{e^2}{2} \left(\frac{a}{K_B T} \right)^2 \frac{k_b + k_u^0}{k_b} \frac{k_u^0}{V_0} F_S \sigma \quad (5.2)$$

Le contenu des chapitres 2 et 4 nous a fourni les valeurs de tous les paramètres présents, excepté k_b . Nous verrons au paragraphe C qu'il est possible de déterminer ce paramètre avec nos expériences. On a donc :

- $a = 1,3 \pm 0,1$ nm
- $k_b = 4,7 \pm 2,4$ s⁻¹ (cf §C)
- $k_u^0 = 0,42 \pm 0,03$ s⁻¹
- $V_0 = 0,6 \pm 0,1$ $\mu\text{m}/\text{s}$
- $F_S = 6,3 \pm 0,7$ pN

On peut donc calculer la valeur du seuil prévu par la théorie :

$$\boxed{\rho_\infty^{min,th} = 400 \pm 200 \text{ moteurs}/\mu\text{m}^2} \quad (5.3)$$

On remarque que les valeurs théorique et expérimentale sont en bon accord, ce qui nous laisse penser que l'analyse théorique décrit bien ce qui se passe expérimentalement. La représentation que l'on a des processus qui donnent lieu à la formation du tube est donc raisonnable.

B.2 Nombre de moteurs impliqués dans l'extraction d'un tube

Il n'est pas possible de mesurer directement expérimentalement le nombre de moteurs qui tirent le tube aux temps très courts. En effet, nous avons vu que l'intervalle correspondant aux temps courts est compris entre 0 et 0,1 s, ce qui est en dessous de la résolution temporelle de nos outils d'acquisition. En microscopie de fluorescence¹, qui est l'outil que nous avons utilisé pour caractériser le seuil et quantifier la distribution de moteurs moléculaires, 100 ms correspondent typiquement au temps d'exposition pour obtenir une image. De plus, la longueur sur laquelle les moteurs qui tirent sont distribués est inférieure à la taille d'un pixel (134 nm avec notre microscope). Enfin, notre système ne permet d'accéder qu'à la somme des moteurs liés et des moteurs non liés le long du tube (même très court). Il n'est donc pas possible

¹le microscope que nous avons utilisé appartient à la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie

Chapitre 5. Etude expérimentale de l'extraction et de la croissance de tubes de membrane : Comparaison avec la théorie

d'extraire simplement la partie correspondant aux moteurs liés. Nous avons donc utilisé les résultats de l'analyse théorique pour déterminer le nombre de moteurs qui tirent un tube au seuil et loin du seuil (voir la partie théorique correspondante ch.3 §B.3.7).

B.2.1 Au seuil

Nous avons vu que le nombre de moteurs qui tirent un tube au seuil de formation est donné par la formule : $n_b^S = \frac{F_0 a}{2K_B T}$

Sachant que dans nos expériences où la tension est fixée à 2.10^{-4} N/m :

- $a = 1,3 \pm 0,1$ nm
- $F_0 = 27,5 \pm 2,5$ pN

on peut calculer le nombre de moteurs qui tirent, au seuil, pour cette force (et donc cette tension) dans la théorie de champ moyen :

$$\boxed{n_b^S \simeq 5 \text{ moteurs}} \quad (5.4)$$

A cette tension de membrane, c'est le nombre minimum de moteurs qu'il faut pour tirer un tube. Il est important de rappeler que ces 5 moteurs s'accumulent de façon dynamique pour tirer le tube. Même si l'argument statique qui consiste à dire que le nombre minimum de moteurs est donné par le rapport entre la force nécessaire pour tirer le tube F_0 et la force maximale que peut exercer une kinésine $F_S, F_0/F_S \sim 5$, donne *a priori* le même résultat, cela ne signifie pas que c'est un mécanisme statique qui régit la formation du tube. Cette coïncidence est liée à la nature même du moteur que nous avons utilisé, qui est tel que le rapport $F_S a / K_B T$ est environ égal à 2.

On peut noter enfin que le nombre de moteurs au seuil que nous avons trouvé, dans la théorie de champ moyen utilisée, est très faible. On peut donc penser que les fluctuations vont être importantes. C'est ce que les simulations présentées plus loin nous permettront de déterminer.

B.2.2 Loin du seuil

Dans les expériences aux temps longs, j'ai travaillé avec une concentration plus élevée en moteurs (0,1%), loin du seuil. Pour déterminer le nombre de moteurs n_b qui tirent dans ce cas, aux temps courts et pour une tension donnée, il faut calculer les constantes Γ (eq. 3.37) et ν (eq. 3.38), puis résoudre l'équation 3.35 que je rappelle :

$$\exp\left(\frac{\nu\Gamma}{n_b}\right) \left(\frac{n_b}{\Gamma}\right)^2 = 1 \quad (5.5)$$

Pour $\sigma = 2.10^{-4}$ N/m et $\rho_\infty = 0,1\% = 2000$ moteurs/ μm^2 , les valeurs de Γ et ν

B. Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane

sont alors :

$$\Gamma = 2\pi \sqrt{\frac{k_b}{k_u + k_b} \frac{V_0}{k_u} \frac{\kappa}{F_S} \rho_\infty} \simeq 27 \quad (5.6)$$

$$\nu = \frac{a}{K_B T} \frac{F_0}{\Gamma} \simeq 0,33 \quad (5.7)$$

La résolution de l'équation 5.5 peut se faire numériquement ou graphiquement à partir du graphique de la figure 5.4. On trouve alors $n_b/\Gamma \simeq 0,8$ et donc :

$$\boxed{n_b \simeq 22 \text{ moteurs}} \quad (5.8)$$

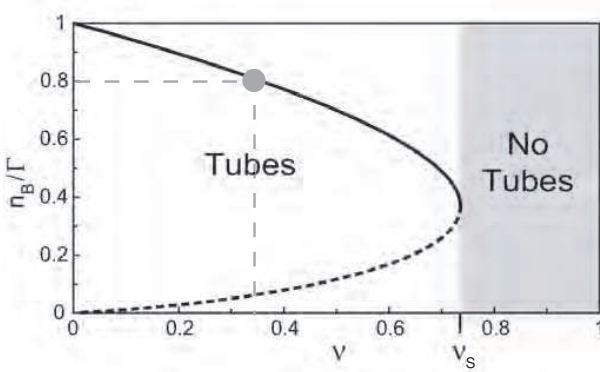


FIG. 5.4 – Diagramme de bifurcation donnant n_b/Γ en fonction du paramètre de bifurcation ν . On remarque que pour $\nu \simeq 0,33$, $n_b/\Gamma \simeq 0,8$.

Aux temps courts, 22 moteurs s'accumulent dans nos conditions pour tirer un tube de façon dynamique. On peut remarquer que ce nombre n'est plus de l'ordre de l'unité, comme au seuil, ce qui signifie que les fluctuations auront moins d'influence sur sa détermination. Ces moteurs peuvent bien entendu se disperser sur plusieurs protofilaments. En fait, l'analyse théorique n'a fait aucune supposition sur l'organisation des moteurs au bout du tube. Nous espérons avoir plus d'informations sur cette organisation en analysant les fluctuations de vitesses de croissance de tube aux temps longs, observées en temps réel. De plus, le nombre de moteurs déterminé ici aux temps courts varie peu dans le temps. Il reste donc valable aux temps longs, dans la mesure où la force F_0 reste constante (ce qui reste vrai pour des tubes de longueurs allant jusqu'à $10 \mu m$).

Pour finir, on peut revenir sur l'influence de la barrière de force à franchir avant de tirer un tube (l'overshoot, voir ch.3 §A.3.2) sur le nombre de moteurs qui doivent extraire le tube. Nous l'avons négligé jusqu'à présent dans le calcul du nombre de moteurs qui tirent au temps courts. On peut maintenant se demander dans quelle mesure cette approximation était raisonnable. En effet, si les moteurs ne tirent pas le tube de façon ponctuelle, il est possible que la barrière de force devienne très importante comme dans la courbe expérimentale obtenue avec des pinces optiques représentée figure 4.20. En effet, Koster et al. [Koster et al., 2005] ont montré que, dans le cas où le tube est tiré par une bille, cette barrière augmente de façon linéaire avec le rayon de la surface d'adhésion de la membrane sur la bille. Dans le cas des

moteurs, on a supposé qu'ils se partageaient la force nécessaire pour tirer le tube et qu'ils exerçaient cette force de façon ponctuelle. Cependant, des travaux récents ont montré que seuls les moteurs qui se trouvent exactement à l'extrémité du tube sont capables d'exercer une force normale sur la membrane (disons par exemple 3 moteurs si les moteurs sont répartis sur 3 protofilaments). Les autres moteurs, qui participent aussi à l'extraction du tube, ne tirent pas directement sur la membrane², mais ils communiquent leur force aux moteurs en tête du fait de leur position côte à côte [O. Campàs et al., travail en cours]. En conséquence, on peut globalement dire que les moteurs se partagent la force de façon équitable (la théorie développée sur la dynamique des tubes n'est donc pas changée), mais que la force exercée par les moteurs l'est de façon ponctuelle par ceux qui sont situés en tête de l'ensemble des moteurs liés au bout du tube.

Il faudrait en théorie tenir compte de la barrière de force supplémentaire liée à la présence de l'overshoot (de l'ordre de 13% de F_0 dans le cas ponctuel) à surmonter lorsque l'on évalue le nombre de moteurs nécessaires pour extraire un tube, mais son effet rentre dans la barre d'erreur de la détermination de la force F_0 et ne changera donc pas n_b de façon importante.

B.3 Simulations

B.3.1 Principe des simulations

Pour comprendre l'influence des fluctuations sur la détermination du nombre de moteurs qui tirent le tube au seuil, O. Campàs a réalisé des simulations de type **Monte Carlo cinétique** (à temps continu) dont le principe est le suivant. Un tube de membrane est représenté par deux séries de cases. La première correspond aux moteurs liés au MT et dans la seconde, les moteurs sont non liés. Dans le cas de moteurs liés, chaque case correspond à un site du MT : elle peut être vide (noté 0) ou occupée (noté 1). Cette série correspond donc à un protofilament unique d'un MT. Dans le cas où les moteurs sont à la surface du tube mais détachés du MT, la case correspondant à la position le long du tube peut être remplie par plusieurs moteurs. Ceci permet de modéliser le caractère bidimensionnel de la surface du tube (voir fig. 5.5). Ensuite, la dynamique des moteurs est décrite par le TASEP (Totally Asymmetric Exclusion Process, voir ch.3 §B.3.2) mis en compétition avec la cinétique de Langmuir (c'est-à-dire que les moteurs peuvent passer de l'état attaché à l'état non attaché avec une certaine probabilité et inversement). Enfin, les simulations tiennent compte de la diffusion des moteurs dans l'état détaché. Les moteurs qui tirent le tube (n_b) sont supposés partager de façon équitable la force nécessaire pour tirer le tube. Les moteurs qui tirent sont ceux qui sont situés côte à côte à l'extrémité du tube (l'ensemble des cases 1 successives au bout du tube, fig. 5.5). Ce nombre n'est pas fixé au départ, c'est une variable stochastique qui peut varier en fonction du temps, suivant la dynamique des moteurs. Le flux entrant de moteurs liés est fixé dans les simulations et peut être relié à la concentration surfacique de moteurs

²celle-ci, en effet, étant fluide, ne peut subir aucune force de cisaillement.

B. Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane

initialement présente sur la vésicule ρ_∞ . La force nécessaire pour tirer le tube est aussi imposée.

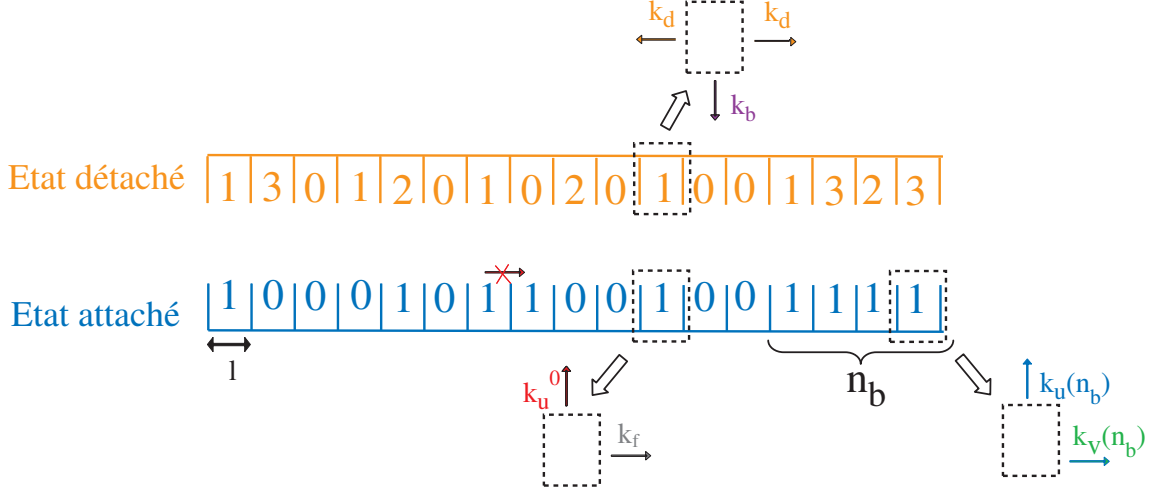


FIG. 5.5 – Principe des simulations de type TASEP en compétition avec la cinétique de Langmuir. Le taux pour un moteur lié de passage au site voisin vide est $k_f = V_0/l$, où l est la taille d'un site (8 nm). Si le site voisin est occupé, le moteur reste sur place. Le taux de passage à un état non lié (taux de détachement) est k_u^0 . Pour un moteur non lié, le taux de passage à un site voisin par diffusion est $k_d = D/l^2$, et celui d'attachement est k_b . Le nombre de moteurs qui tirent le tube est n_b , ils se partagent la force et leur nombre peut varier en fonction du temps. De plus, au bout du tube, il faut tenir compte de l'influence de la force sur le taux de détachement : k_u dépend de n_b , comme nous l'avons vu aux chapitres 2 et 3. Le moteur du bout avance avec un taux $k_v = V(n_b)/l$.

B.3.2 Description du seuil

Les résultats obtenus par le modèle précédent pour la détermination du seuil en tension, et donc en force, en fonction de la densité surfacique de moteurs sont représentés figure 5.6(A).

Il est intéressant de remarquer sur la figure 5.6(A) que la force au seuil sature en fonction de la densité surfacique de moteurs, contrairement à ce qui avait été prévu avec l'analyse de champ moyen. En effet, les moteurs ne peuvent pas s'accumuler indéfiniment au bout du tube pour créer une force de plus en plus importante. Lorsque la longueur d'accumulation des moteurs sur un seul protofilament est trop grande, elle est gouvernée par la cinétique de Langmuir (attachement/détachement) et finit par saturer [Campàs et al., 2005a]. On observe ainsi que la force maximale que les moteurs peuvent exercer en s'associant le long d'un seul protofilament est 12 pN. Or, dans nos expériences, nous avons vu que cette force est de l'ordre de 27 pN. On comprend donc qu'il faut que les moteurs s'associent sur au moins 3 protofilaments pour qu'ils puissent fournir 27 pN. La comparaison simulation/expérience montre

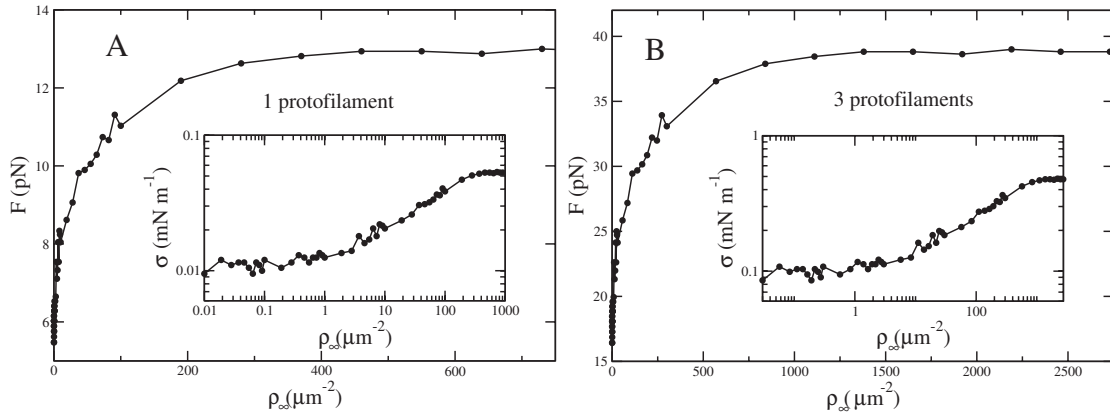


FIG. 5.6 – Force correspondant à la tension seuil (avec $\kappa=10 K_B T$) en fonction de la densité surfacique de moteurs ρ_∞ initiale. Encart : logarithme de la tension seuil en fonction du logarithme de ρ_∞ . (A) Les courbes ont été obtenues par simulations selon un protofilament. (B) Les courbes ont été obtenues en multipliant la force et ρ_∞ de la courbe (A) par 3. La tension seuil est ensuite calculée à partir de la force.

qu'il faut exactement 3 protofilaments (on note que la zone de contact MT-tube de membrane n'est pas suffisamment large pour que les moteurs puissent s'attacher sur plus de 3 protofilaments). On peut cependant déjà voir que, en multipliant par 3 la force représentée sur la courbe de la figure 5.6(A) ainsi que ρ_∞ (ce qui suppose que les moteurs sur chaque protofilament soient indépendants), la densité correspondant à 27 pN est de l'ordre de 170 moteurs par μm^2 (fig. 5.6(B)). Là encore, cette estimation est en très bon accord avec les résultats obtenus expérimentalement.

B.3.3 Détermination du nombre de moteurs qui tirent le tube

Il est aussi possible de déterminer la distribution du nombre de moteurs qui tirent le tube pour des concentrations légèrement supérieures à celle du seuil, pour une force égale à $27/3=9$ pN (pour un protofilament) et une densité de moteurs égale à $300/3=100$ moteurs/ μm^2 . Ces conditions imposées correspondent presque aux expériences que nous avons effectuées. Il n'était pas possible de faire les simulations exactement au seuil puisqu'aucun tube n'est tiré. Les résultats obtenus sont représentés figure 5.7.

On remarque que le nombre moyen de moteurs qui tirent un tube juste au dessus du seuil et pour un protofilament est 2,5 moteurs. Ainsi, pour trois protofilaments indépendants, on peut dire qu'environ $7,6 \pm 2,7$ moteurs tirent le tube. Ce nombre, qui doit être supérieur à celui du seuil, est en bon accord avec celui qu'on avait calculé avec l'analyse théorique : environ 5 moteurs (calculé à partir de 200 moteurs/ μm^2), mais néanmoins supérieur, montrant qu'il faut prendre les fluctuations en compte.

B. Etude aux temps courts de la formation de tubes de membrane

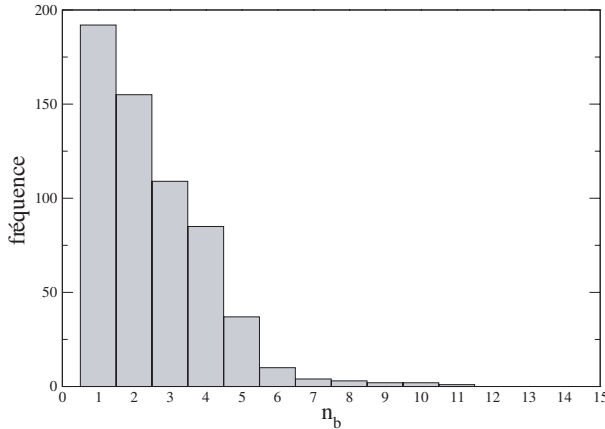


FIG. 5.7 – Histogramme donnant le nombre de moteurs qui tirent un tube, juste au dessus du seuil. Le nombre moyen de moteurs qui tirent est 2,5. Simulations : O. Campàs.

B.4 Cas des vésicules rigides

Un autre point qu'il est intéressant de remarquer dans l'expression du seuil (eq. 5.2) est que la densité surfacique minimale en moteurs dépend de la tension de membrane mais pas de la rigidité de courbure. Nous avons donc eu l'idée de vérifier ce point en mesurant de la même façon le seuil en ρ_∞ pour des vésicules ayant une rigidité de courbure significativement différente. Nous avons donc utilisé des vésicules "rigides" contenant un mélange équimolaire SM/Cholestérol, dont le κ est égal $65 K_B T$. Les vésicules contenaient aussi des lipides biotinylés en concentration variable et un fluorophore pour détecter la formation des tubes. Une différence de pression osmotique égale à 20 mOsm a été appliquée comme précédemment entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule. Cependant, il n'a pas été possible d'augmenter la tension des vésicules de cette façon. En effet, nous avons vu au chapitre 4 §B.3.3 que ces vésicules rigides sont complètement imperméables à l'eau aux échelles de temps d'observation de notre système. Elles restent donc fluctuantes quelle que soit la différence de pression osmotique appliquée.

Pour ces vésicules rigides et peu tendues, il n'a pas été possible de trouver un seuil en densité surfacique de moteurs. En effet, même pour les plus faibles concentrations en lipides biotinylés, des tubes sont toujours observés, même lorsque le nombre de moteurs fixés spécifiquement aux lipides biotinylés était du même ordre de grandeur que le nombre de moteurs fixés non spécifiquement (voir les tubes fig. 5.8).

Pour limiter l'adhésion non spécifique, des vésicules contenant des lipides PEG et des lipides PEG-biotinylés ont été utilisées. Lorsque la vésicule contient environ 5% de lipides PEG, l'adhésion non spécifique de la streptavidine devient négligeable (D. Cuvelier, communication personnelle). On peut ensuite fixer la concentration en lipides PEG biotinylés pour contrôler le nombre de moteurs qui s'accrochent. Les "tubes assays" effectués avec des vésicules rigides contenant des lipides PEG et PEG-biotinylés ont permis de mesurer un seuil de l'ordre de 0,005%, soit environ 100 moteurs/ μm^2 . Cependant, comme il n'est pas possible de connaître la tension de membrane associée, il n'est pas possible de faire une étude plus quantitative que précédemment. Il serait intéressant de pouvoir coupler ces expériences de détection de seuil avec des expériences de pinces optiques par exemple, pour pouvoir tirer des tubes de membrane avec une bille en même temps que les kinésines avec l'ATP.

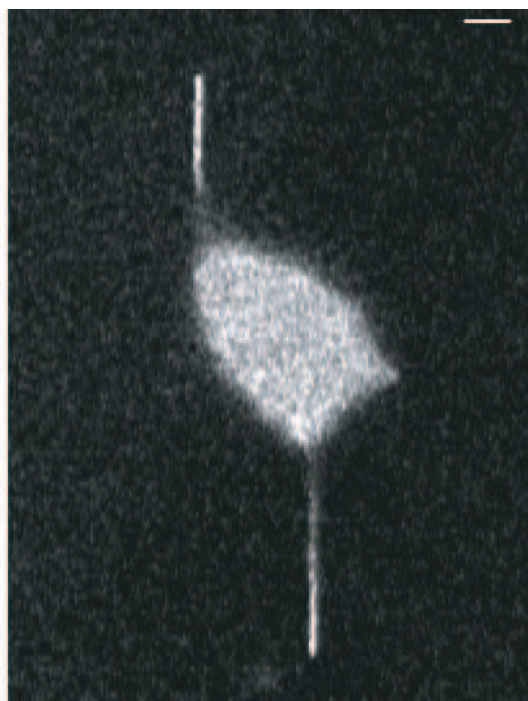


FIG. 5.8 – Image de tubes de membrane extraits d'une vésicule rigide (SM/cholestérol 1 :1) contenant 0,0005% de lipides biotinylés et 1% de lipides fluorescents obtenue en microscopie confocale. On ne voit que le plan contenant les tubes et la surface d'adhésion de la vésicule (celle-ci se trouve au dessus du plan observé). Barre= $5\mu m$.

Ainsi, on pourrait simultanément avoir une mesure de la tension de membrane. Une autre possibilité serait d'utiliser d'autres compositions lipidiques, correspondant à des membranes rigides, mais plus perméables (SOPC/cholestérol 1 :1, $\kappa = 75 K_B T$ [Pécreaux, 2004]).

C Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

L'analyse aux temps longs consiste à décrire la dynamique de répartition des moteurs moléculaires le long d'un tube de membrane une fois que le tube est extrait. Nous avons vu que la limite des temps courts correspond à $t > 0,1$ s.

C.1 Résultats expérimentaux

C.1.1 Films de croissance de tubes

✓ *Conditions expérimentales*

Pour étudier la répartition des moteurs moléculaires le long d'un tube, nous avons marqué en fluorescence les sites d'accrochage des kinésines, c'est-à-dire les lipides biotinylés. Nous avons utilisé pour cela les lipides DSPE-Rhod-Biot présentés au ch.4 §A.4.3, synthétisés dans le groupe de Line Bourel-Bonnet à l'Institut Pasteur de Lille [Jolimaitre et al., 2005]. Le fait d'avoir un fluorophore par moteur va nous permettre de faire une analyse quantitative d'intensités relatives de fluorescence et d'en déduire la répartition des moteurs le long du tube. Bien entendu, il n'est pas possible, dans ce cas, de distinguer entre la population des moteurs liés et des

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

moteurs détachés du MT. On observe simplement la somme des deux densités de moteurs : $\rho_b + \rho_u$.

Pour étudier la dynamique des moteurs qui tirent le tube, nous avons utilisé des vésicules :

- avec une tension de membrane $\sigma = 2.10^{-4}$ N/m
- constituées essentiellement d'EPC, donc avec une rigidité de courbure $\kappa=10 K_B T$
- contenant 0,1% de DSPE-Rhod-Biot, ce qui correspond à 10 fois la densité surfacique en moteurs minimale pour tirer un tube.

Lors d'un "tube assay" effectué loin du seuil, comme c'est le cas ici, les tubes de membrane sont tirés de façon presque instantanée dès que la vésicule atteint la surface de la lamelle recouverte de MTs. Nous avons vu que, comme la tension de membrane est relativement élevée, le nombre de tubes tirés par vésicule n'est pas très grand.

✓ Observations

Un exemple de tube tiré à partir d'une vésicule est représenté figure 5.9. Sur cette image, il est intéressant de remarquer l'accumulation de fluorescence au bout du tube correspondant à une accumulation de moteurs. Ceci signifie que les moteurs s'associent au bout du tube pour tirer. Cette observation corrobore effectivement l'analyse théorique qui prévoit qu'une accumulation dynamique des moteurs doit avoir lieu au bout du tube pour que celui-ci soit tiré (voir ch.3 §B.2.2).



FIG. 5.9 – Image (en vidéomicroscopie de fluorescence) d'un tube de membrane tiré à partir d'une vésicule par des kinésines, dont les sites d'accrochage sont marqués en fluorescence. On observe l'accumulation de fluorescence et donc de moteurs au bout du tube qui se fait de façon dynamique lorsque le tube est tiré. Barre= $2 \mu\text{m}$.

Il est possible de prendre une série d'images au cours de la croissance d'un tube pour caractériser sa dynamique. Typiquement, les séquences que nous avons acquises étaient de 3 minutes à la cadence d'une image prise par seconde, avec un temps d'exposition de 200 ms avec la caméra CCD utilisée. Il était difficile de descendre en dessous de cette cadence étant donnée la limitation mécanique

Chapitre 5. Etude expérimentale de l'extraction et de la croissance de tubes de membrane : Comparaison avec la théorie

liée à l'ouverture et la fermeture de l'obturateur du microscope. Le montage de vidéomicroscopie que nous avons utilisé comporte un microscope inversé Leica, muni d'une caméra très sensible (Micromax de chez Princeton Instruments, Trenton NJ) et piloté entièrement par le logiciel Metamorph. La lumière d'excitation était fournie par une lampe à vapeur de mercure et un jeu de filtres Cy3 ($\lambda_{exc} = 510 - 550$ nm, $\lambda_{em} = 550 - 590$ nm). Un exemple de séquence d'images obtenue est représenté figure 5.10.

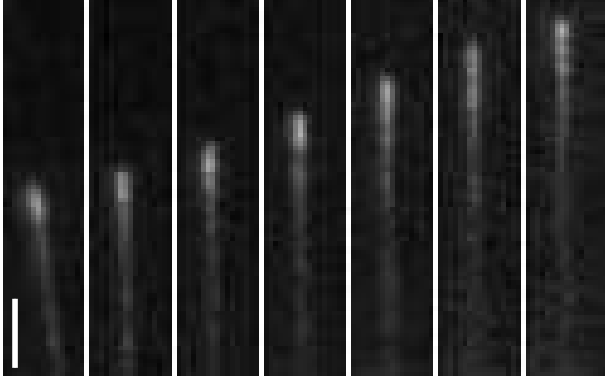


FIG. 5.10 – Séquence d'images montrant le tube représenté figure 5.9 lorsqu'il croît avec le temps. Ici, chaque image est espacée de 5 s mais il est possible de descendre jusqu'à une cadence de 1 image/s. Barre=2 μm .

✓ Nécessité d'utiliser une bonne caméra

Pour observer en fluorescence les sites d'accrochage des moteurs sur un tube en train d'être tiré, il était nécessaire d'utiliser une caméra très sensible. En effet, on peut compter le nombre de fluorophores par micron de tube pour évaluer le niveau d'intensité des objets observés. Sur la vésicule, $\rho_\infty = 0,1\%$ soit $2 \cdot 10^3$ moteurs/ μm^2 et de plus, on peut écrire la relation approchée entre les densités de moteurs le long du tube (loin des bouts) et ρ_∞ . Cette relation est obtenue en écrivant les équations dynamiques qui régissent la répartition des moteurs liés et non liés dans chacune des régions du système, (dont la géométrie est rappelée fig. 5.11(B)) et en écrivant les relations de continuité entre chaque région (voir ch.3 §B).

$$\rho_b^\infty + \rho_u^\infty \simeq \rho_b^\infty \frac{k_b}{k_u^0 + k_b} = 2\pi R_0 \rho_\infty \quad (5.9)$$

En utilisant des valeurs typiques :

- $R_0 = 10$ nm
- $k_b \simeq 5$ s $^{-1}$
- $k_u^0 \simeq 0,5$ s $^{-1}$

on trouve que la somme des densités est de l'ordre de 120 moteurs par microns. Un pixel faisant 134 nm, on remarque qu'il n'y a qu'une quinzaine de fluorophores par pixel, d'où le besoin d'une caméra très sensible pour observer les inhomogénéités de fluorescence liées à la dynamique des moteurs, et une source d'excitation des fluorophores adaptée. En effet, les observations de tubes effectuées avec un microscope confocal, utilisant un laser helium-néon (raie faible $\lambda = 543$ nm) pour exciter les rhodamines et un photomultiplicateur pour récupérer les photons émis

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

par fluorescence, n'ont jamais permis de voir aucune inhomogénéité de fluorescence le long de tubes. On peut par exemple comparer les images 5.1(B) obtenue au confocal et 5.9 obtenue par vidéomicroscopie exactement dans les mêmes conditions de tension et de densité surfacique de moteurs.

C.1.2 Remarque sur l'angle entre la vésicule et le tube de membrane

On peut remarquer figure 5.9 que le tube près de la vésicule n'est pas au contact de la surface³. On comprend mieux cet écart si on observe la figure 5.11(A) qui montre une vue de côté d'un tube de membrane tiré à partir d'une vésicule. Cette vue de côté a été obtenue par microscopie confocale en faisant une série d'images successives dans la direction perpendiculaire à la surface des MTs et en reconstruisant en trois dimensions le système vésicule-tube. Il suffit ensuite d'effectuer une projection dans le plan souhaité. On voit que le tube fait un angle avec la surface contenant le réseau de MTs et la zone de contact avec la vésicule, ce qui permet d'expliquer l'apparente "déconnexion" du tube et de la vésicule dans le plan d'observation au niveau de la surface de lamelle et du réseau de MTs. En fait, cette connexion existe mais a lieu hors du champ d'observation.

L'analyse théorique tient compte de cette géométrie (fig. 5.11(B)). Cela avait permis de faire correctement les bilans de flux de moteurs liés au niveau des différentes régions du système.

L'origine de la formation de cet angle vient du fait que la position stable d'un tube de membrane correspond au cas où il est perpendiculaire à la membrane (le prolongement de la direction du tube passe par le centre de la vésicule). Ceci peut être observé par exemple sur la figure 5.11(A). La configuration où la connexion tube-vésicule se fait au niveau de la surface de contact de la vésicule avec la lamelle (sur le réseau de MTs), n'est observée que lors de l'étape de formation du tube, puisque la très grande courbure au niveau de la connexion coûte beaucoup d'énergie (voir la flèche fig. 5.12). Très vite, cette géométrie n'est plus stable.

La valeur de l'angle de contact appelé θ (fig. 5.11(B)) est déterminée par deux conditions :

1. L'axe du tube doit passer par le centre de la vésicule.
2. L'énergie de courbure créée au niveau du coude (passage zone II-zone III fig. 5.11(B)) doit être contrebalancée par l'énergie d'adhésion des moteurs liés le long du tube. Si on appelle W l'énergie d'adhésion des moteurs liés par unité de longueur, l'angle doit vérifier l'équation suivante, qui résulte du bilan des forces au niveau du coude :

$$W = -F_0(1 - \cos \theta) \quad (5.10)$$

Cette énergie est négative puisqu'elle correspond à la force répulsive exercée par les moteurs pour maintenir le tube au niveau de la connexion II-III. Cette force s'oppose

³ainsi que le halo qui l'entoure lié à la grande profondeur de champs de l'objectif X100 utilisé et la présence du corps de la vésicule au-dessus du plan d'observation

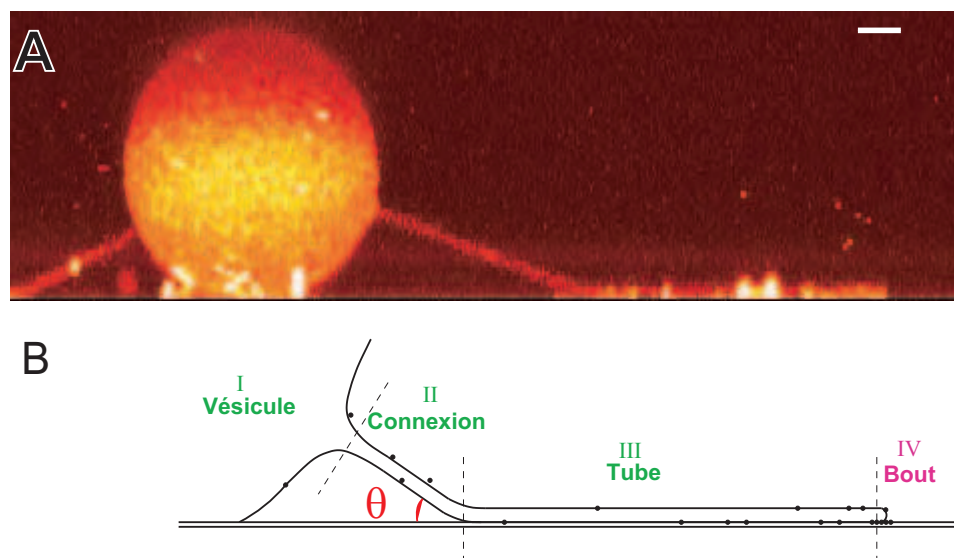


FIG. 5.11 – Angle de contact tube-vésicule. (A) Image obtenue par microscopie confocale d'un tube de membrane tiré à partir d'une vésicule. Une reconstruction 3D de l'objet puis une projection dans le plan perpendiculaire au plan des MTs passant par le tube ont été effectuées. Barre= $2 \mu m$. (B) Représentation schématique d'un tube de membrane tiré. On distingue quatre régions : la vésicule, la zone de connexion, le tube et le bout du tube.

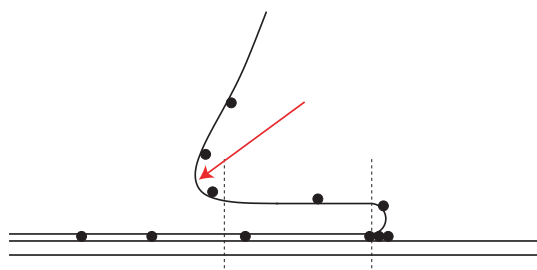


FIG. 5.12 – Représentation schématique de l'extraction d'un tube. La connexion tube-vésicule fait apparaître une zone de très forte courbure repérée par la flèche.

à la force qui aurait tendance à détacher le tube qui, elle, est positive. Sachant que l'on a mesuré des valeurs de θ autour de 25° , que dans nos conditions expérimentales $F_0=27$ pN, l'énergie W calculée avec la formule 5.10 vaut : $W = -2,8 \cdot 10^{-12}$ J/m. On peut vérifier que cette description est cohérente avec la distribution des moteurs que l'on a déterminée au-dessus. Si on suppose, en première approximation, que l'énergie d'adhésion des moteurs le long du tube est donnée par la somme de l'énergie d'adhésion de chaque moteur individuel, on a :

$$W \simeq \rho_b w_m \quad (5.11)$$

Cette description serait exacte si les moteurs étaient fixes. Or, ils avancent, ce qui peut créer des effets de pression osmotique à 2D dans la membrane [Brochard-Wyart and de Gennes, 2002], qui changeraient l'expression de W . Sa-

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

chant que k_u^0 est petit devant k_b on peut dire que la densité linéique totale des moteurs le long du tube est donnée par celle des moteurs liés. On a donc $\rho_b \simeq 120$ moteurs/ μm . De plus, l'énergie d'adhésion par moteur vérifie :

$$\frac{-w_m}{K_B T} = \ln \left(\frac{k_b}{k_u^0} \right) \quad (5.12)$$

On peut donc calculer W en utilisant les équations 5.11 et 5.12, on a : $W = -1,2 \cdot 10^{-12}$ J/m. Étant donné le caractère approximatif de l'équation 5.11, on peut dire que la description de l'énergie d'adhésion W du tube sur la surface en termes d'accrochage des moteurs le long du MT est raisonnable.

C.1.3 Coalescence de tube

Lorsque deux tubes sont tirés de la même vésicule et que la distance qui les sépare n'est pas très élevée (par exemple parce que les deux tubes sont tirés le long d'un même MT), nous avons vu au ch.3 §A.3.4 que les tubes doivent coalescer. C'est en effet ce que nous avons observé expérimentalement (voir la séquence d'images figure 5.13).

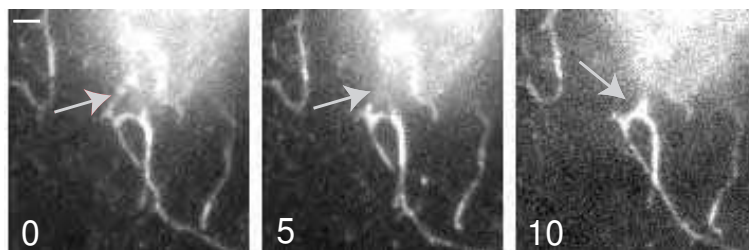


FIG. 5.13 – Séquence d'images montrant la coalescence de deux tubes tirés à partir de la même vésicule. Images obtenues en microscopie de fluorescence, 1 image/5 s. Barre=2 μm .

C.2 Analyse

C.2.1 Kymographes

Pour caractériser la dynamique des moteurs lors de la croissance d'un tube, nous avons effectué une analyse systématique de la fluorescence le long du tube en fonction du temps pour 20 tubes grâce à une macro du logiciel Métamorph. Cette analyse permet de tracer un diagramme à 3 dimensions appelé kymographe, qui donne l'intensité de fluorescence (codée en niveaux de gris) le long de la trajectoire suivie par un tube (axe y) en fonction du temps (axe x). Un exemple de kymographe est présenté figure 5.14; il correspond à la séquence d'images présentée figure 5.10.

Pour tracer un kymographe, il faut présélectionner la trajectoire qui sera suivie par le tube. Il est possible de varier la taille du cadre où on détecte la trajectoire, de

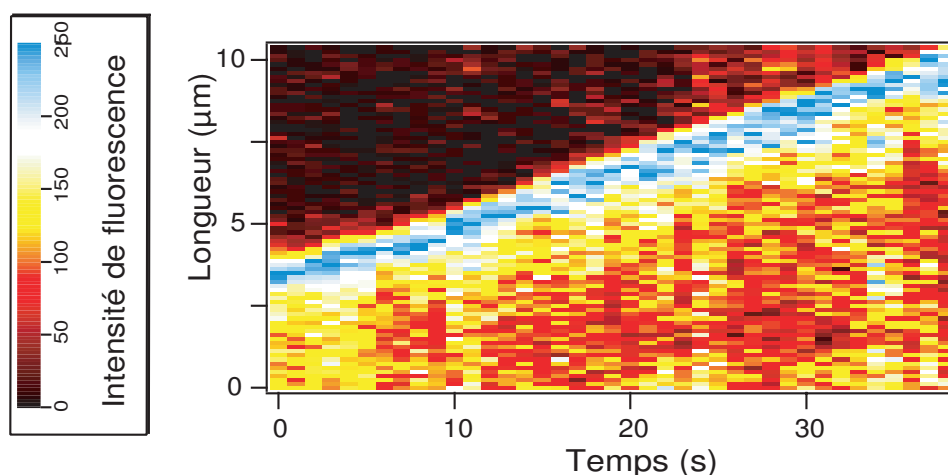


FIG. 5.14 – Exemple de kymographe : diagramme à 3D donnant l'intensité de fluorescence (code de couleur) le long de la trajectoire suivie par un tube (axe y) en fonction du temps (axe x). Ce diagramme a été tracé avec le logiciel Métamorph. Le bout du tube correspond à la partie la plus fluorescente (bleue), le reste du tube est rouge alors que le fond est noir.

façon à ce que, même si le tube (ou le MT) n'est pas bien accroché à la surface, il soit tout de même possible de déterminer son profil d'intensité de fluorescence (fig. 5.15). Celui-ci est tracé, pour un instant donné, en calculant le maximum d'intensité de fluorescence le long de chaque section de la trajectoire. Tous les profils d'intensité de fluorescence le long de la trajectoire sont ensuite juxtaposés dans le sens des temps croissants.

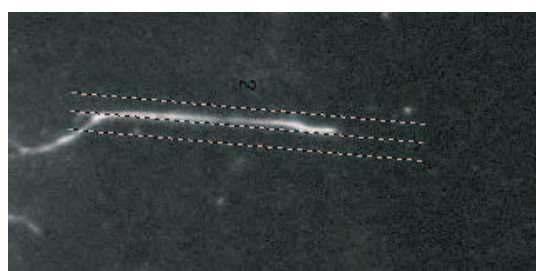


FIG. 5.15 – Trajectoire sélectionnée le long de laquelle un tube de membrane avance. Pour tracer un kymographe, il faut, pour chaque image d'une séquence, mesurer le maximum d'intensité de fluorescence le long de chaque section de la trajectoire, puis juxtaposer tous les profils de fluorescence dans le sens du temps croissant.

C.2.2 Profil d'intensité de fluorescence avec une croissance exponentielle

Un profil d'intensité de fluorescence représente la densité linéique totale de moteurs le long d'un tube à un instant donné; il correspond à une colonne du kymographe. Un exemple de profil est représenté figure 5.16. L'intensité de fluorescence est normalisée par sa valeur loin du bout du tube, le fond n'a pas une intensité nulle puisqu'il représente l'intensité de fluorescence le long du microtubule (sans tube). Cette dernière n'est pas nulle probablement à cause de la présence de complexes

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

kinésine-streptavidine liés au MT auxquels sont accrochés des résidus de membrane fluorescente.

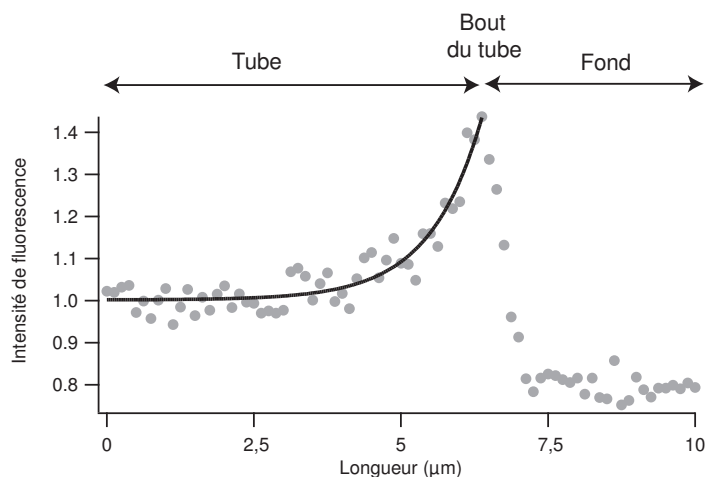


FIG. 5.16 – Exemple de profil d'intensité de fluorescence le long d'un tube de membrane où les sites d'accrochage des moteurs sont marqués. Ce profil correspond à l'instant $t=15$ s sur le kymographe présenté figure 5.14. On distingue le tube, le bout du tube (où l'intensité de fluorescence augmente de façon exponentielle) et le fond. L'intensité de fluorescence est normalisée par la valeur de la fluorescence loin du bout du tube. La ligne continue correspond à l'ajustement obtenu avec l'équation 5.13. La valeur obtenue pour λ dans ce cas est $1,1 \mu m$.

On peut remarquer de plus que l'intensité de fluorescence augmente au bout du tube et il est possible d'ajuster cette croissance avec une exponentielle, en accord avec la description théorique (voir les eq. 3.54). L'équation utilisée pour l'ajustement fait apparaître une longueur caractéristique appelée λ :

$$\rho/\rho_{max} = 1 + a \exp\left(\frac{x - x_0}{\lambda}\right) \quad (5.13)$$

où x_0 est fixée et est égale à la position du bout du tube (du maximum d'intensité)⁴. La valeur obtenue dans le cas du profil représenté figure 5.16 est $1,1 \mu m$. Il est possible de déterminer de façon plus systématique cette longueur caractéristique λ pour chaque instant grâce à un programme d'analyse des kymographes écrit avec le logiciel Igor Pro Carbon (WaveMetrics). La courbe donnant λ en fonction du temps dans le cas du tube représenté dans la séquence figure 5.10 se trouve figure 5.17 :

A chaque valeur de λ instantanée peut aussi être associée une vitesse de croissance de tube qui a été mesurée.

⁴les équations théoriques 3.54 font apparaître un x dont la référence $x = 0$ est placée au bout du tube et le sens de croissance est celui du mouvement.

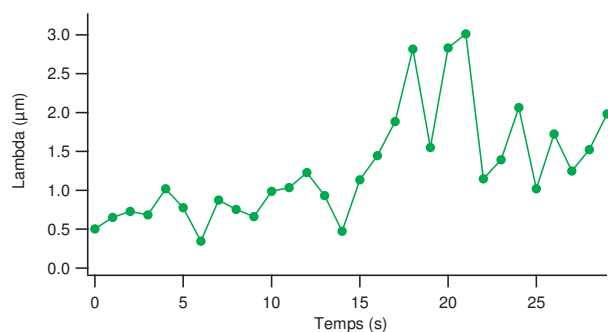


FIG. 5.17 – Longueur caractéristique de croissance exponentielle λ du profil d'intensité de fluorescence en fonction du temps, dans le cas du tube représenté fig. 5.10.

C.2.3 Vitesse du bout du tube

A partir du kymographe, il est possible de déterminer la position du bout du tube, pour chaque image, en cherchant la position le long de la trajectoire où l'intensité de fluorescence est maximale (exemple fig. 5.18(A)). On peut de plus calculer la vitesse instantanée du bout du tube par dérivation de la position (exemple fig. 5.18(B)).

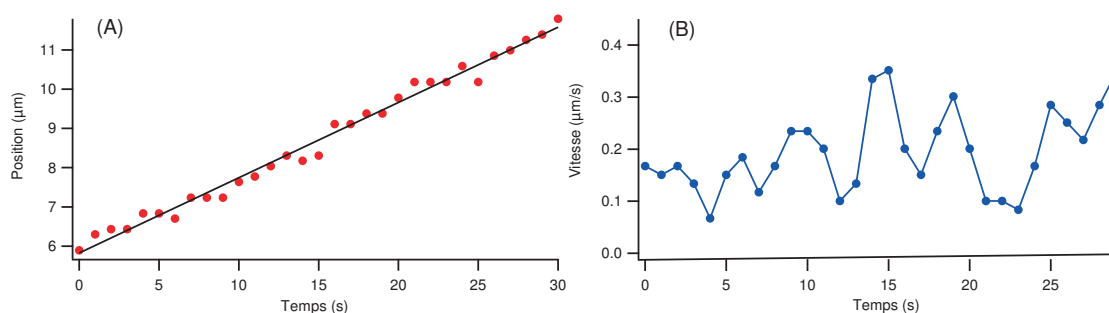


FIG. 5.18 – (A) Position du bout du tube en fonction du temps, dans le cas du tube représenté fig. 5.10. La ligne continue représente l'ajustement linéaire pour déterminer la vitesse moyenne du tube. (B) Vitesse instantanée du bout du tube V en fonction du temps, obtenue par dérivation de la position.

Un ajustement linéaire de la position du bout du tube en fonction du temps permet de donner la vitesse moyenne de croissance du tube. L'histogramme figure 5.19 représente les vitesses moyennes obtenues pour les 20 tubes analysés dans des conditions de tension et de densité surfacique de moteurs mentionnées au début de cette partie. On obtient une vitesse moyenne de croissance dans ces conditions égale à : $V=0,09 \pm 0,06 \mu m/s$ (valeur + dispersion des données). Bien entendu, la vitesse moyenne de croissance dépend beaucoup des conditions en tension et densité de moteurs imposées. On peut remarquer par exemple que pour des vésicules fluctuantes, il a été possible d'observer des vitesses de croissance allant jusqu'à $0,5 \mu m/s$.

Les vitesses obtenues expérimentalement sont en bon accord avec les vitesses obtenues par simulation dans les mêmes conditions de densité surfacique de moteurs et de tension de membrane (donc de force). Cependant, elles ne correspondent pas à la valeur qu'on trouverait en injectant simplement le nombre moyen de moteurs

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

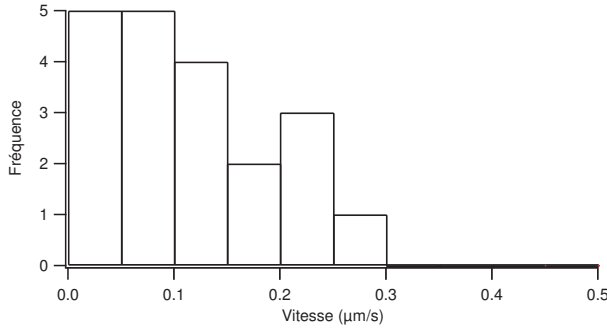


FIG. 5.19 – Histogramme des vitesses moyennes obtenues pour 20 tubes tirés dans les conditions décrites précédemment ($\sigma=2.10^{-4}$ N/m et $\rho_{\infty}=0,1\%$).

qui tirent (par exemple 5 au seuil et 22 dans les conditions décrites ci-dessus) dans la formule approchée de la vitesse (eq. 3.21) :

$$\frac{\langle V \rangle}{V_0} \neq 1 - \frac{F_0}{F_S} \frac{1}{\langle n_b \rangle} \quad (5.14)$$

En effet, avec $V_0=0,6 \mu\text{m/s}$, $F_0=27$ pN, $F_S=6$ pN et $n_b=22$ moteurs, on trouve : $V_{calc}=0,5 \mu\text{m/s}$ et une vitesse expérimentale de l'ordre de $0,1 \mu\text{m/s}$. Le problème vient du fait qu'en utilisant une valeur moyenne pour n_b , l'effet des fluctuations est complètement masqué. On peut remarquer en effet dans le diagramme qui donne la distribution de probabilité de n_b (fig. 5.7) que la distribution n'est pas du tout piquée sur la valeur de n_b moyen (égale à 2,5 dans le cas avec 1 protofilament, et environ 7,5 avec 3 protofilaments). C'est en fait "la queue" de la distribution qui va changer la valeur de la vitesse calculée. Il faut en effet, pour calculer correctement la vitesse, utiliser la distribution de probabilité de n_b qu'on peut appeler $f(n_b)$. Alors :

$$\frac{\langle V \rangle}{V_0} = \sum_{n_b} \left(1 - \frac{F_0}{F_S} \frac{1}{n_b} \right) f(n_b) \quad (5.15)$$

la somme portant sur toutes les valeurs de n_b de 0 à l'infini. Si on calcule correctement la vitesse, en utilisant la distribution de n_b qui a été calculée dans nos conditions en σ et ρ_{∞} , on trouve une valeur raisonnable de la vitesse, de l'ordre de $0,1 \mu\text{m/s}$.

C.2.4 Expériences de contrôle

Pour déterminer si la croissance exponentielle observée sur les profils de fluorescence est bien liée à la dynamique des moteurs, et donc à la présence du lipide biotinyllé-rhodaminé dans la membrane des vésicules, nous avons fait des expériences qui consistaient à ne pas utiliser ce lipide DSPE-Rhod-Biot. Nous avons utilisé à la place des vésicules EPC, contenant 0,1% de lipides biotinyllés (mais non fluorescents) et 0,1% de lipide-Texas Red dans la membrane. Comme le fluorophore est découplé des sites d'accrochage des moteurs, on s'attend à ce que la fluorescence de la membrane reste uniforme à la fois dans la vésicule et dans le tube. C'est en effet ce que nous avons observé, pour des expériences réalisées exactement dans les mêmes conditions par ailleurs (kinésines, MTs, paramètres d'acquisitions du microscope etc.). La figure 5.20(A) montre une image de tube tiré dans ces conditions de marquage uniforme, et la figure 5.20(B) montre le profil d'intensité de fluorescence

Chapitre 5. Etude expérimentale de l'extraction et de la croissance de tubes de membrane : Comparaison avec la théorie

correspondant, normalisée aussi par l'intensité de fluorescence loin du bout du tube. L'absence de croissance exponentielle de l'intensité de fluorescence montre bien que celle-ci est liée à l'accumulation dynamique des moteurs lorsqu'ils sont marqués, même indirectement.

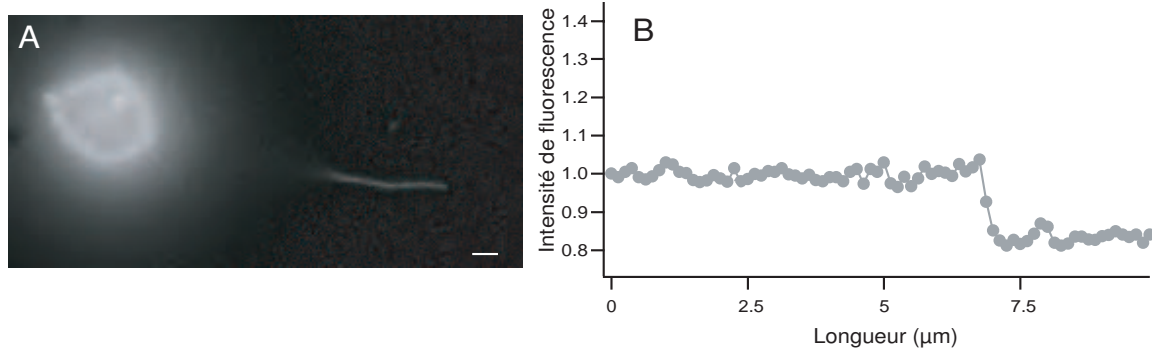


FIG. 5.20 – (A) Tube de membrane tiré à partir d'une vésicule dont les sites d'accrochage des kinésines ne sont pas spécifiquement marqués. On remarque que l'intensité de fluorescence est uniforme le long du tube. La distance entre le tube et la vésicule marque la présence d'un angle entre le tube et la vésicule. Barre=2 μm. (B) profil d'intensité de fluorescence le long du tube, normalisée par l'intensité loin du bout du tube. Il n'y a pas d'accumulation exponentielle de fluorescence.

C.3 Comparaison avec la théorie

C.3.1 Détermination de k_b

Nous avons vu que, pour chaque instant lors de la croissance d'un tube, il est possible de déterminer à la fois la longueur caractéristique λ et la vitesse instantanée du tube. C'est ce que nous avons effectué pour 20 tubes qui ont poussé sur une durée de 30s à 3 minutes. L'ensemble des couples λ en fonction de V ou plus précisément λ en fonction de $(V_0 - V)$ sont représentés figure 5.21. Environ 400 données sont représentées, mais chaque point correspond la valeur moyenne des λ obtenus pour chaque vitesse, avec comme barre d'erreur la déviation standard.

Sachant qu'il a été montré théoriquement que λ dépend de la vitesse de croissance du tube, voir eq. 3.53 rappelée ici :

$$\lambda = 2 \frac{V_0 - V}{k_u^0} \frac{1}{\sqrt{1 + 4 \frac{k_b}{k_u^0} \frac{(V_0 - V)^2}{k_u^0 D} - 1}} \quad (5.16)$$

et que l'ensemble de paramètres qui interviennent sont connus (k_u^0 , D , V_0) excepté le taux d'attachement d'une kinésine sur un MT k_b , il est possible d'ajuster les données expérimentales en utilisant l'équation 5.16, avec un paramètre (k_b/D), en pondérant les données expérimentales par leur déviation standard. Il est préférable d'utiliser

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

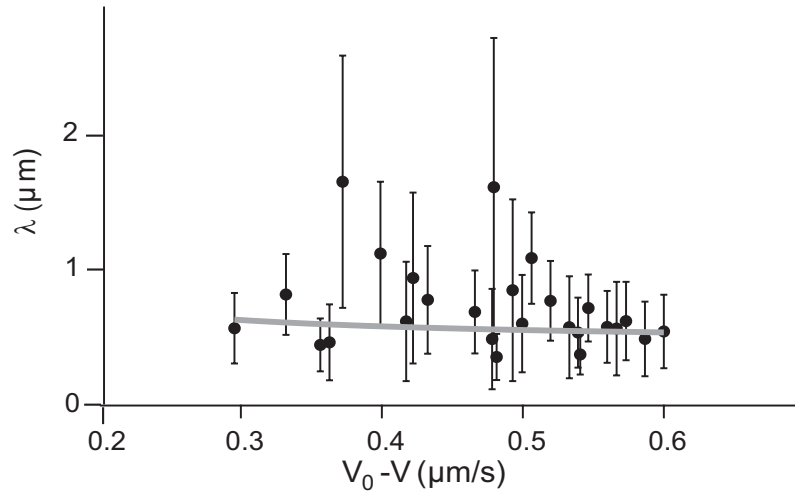


FIG. 5.21 – Différentes valeurs expérimentales de λ représentées en fonction de $V - V_0$, obtenues à partir de 20 tubes. Chaque point correspond à la moyenne de l'ensemble de valeurs de λ obtenues pour une même vitesse avec sa déviation standard. La courbe continue correspond à l'ajustement non-linéaire, pondéré, à un paramètre, effectué à partir de l'équation 5.16 qui permet d'obtenir : $k_b = 4,7 \pm 2,4 \text{ s}^{-1}$. D'après [Leduc et al., 2004].

k_b/D comme paramètre plutôt que k_b car il est ainsi possible de reporter l'incertitude de D sur k_b . On trouve ainsi : $k_b/D = 4,7 \pm 0,5 \mu\text{m}^{-2}$. Comme $D = 1,0 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}^5$, on a :

$$\boxed{k_b = 4,7 \pm 2,4 \text{ s}^{-1}} \quad (5.17)$$

Une valeur approchée de k_b peut être obtenue en écrivant $k_b = D / \langle \lambda \rangle^2 \simeq 3,6 \pm 1,8 \text{ s}^{-1}$ (c'est-à-dire que λ est indépendante de la vitesse), dans la limite où $\omega \equiv \frac{V_0 - V}{k_b^0} \sqrt{\frac{k_b}{D}} \gg \frac{1}{2}$. En utilisant les valeurs de V_0 , $\langle V \rangle$, k_b , D connues, on obtient en effet $\omega \simeq 2$, ce qui est bien conforme avec la faible dépendance de λ avec la vitesse (fig. 5.21). Comme nous l'avons remarqué lors de l'introduction du taux d'attachement, k_b , au ch.2 §B.3.2, ce paramètre dépend de la géométrie du système qui est ici cylindrique. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque de la kinésine, il n'est donc pas possible de le comparer à des valeurs obtenues par d'autres groupes. Cependant, en utilisant [Boulbitch et al., 2001], il est possible de calculer le temps caractéristique d'une réaction d'accrochage ligand-récepteur à 2D connaissant le taux d'association à 3D. Si on applique ce calcul à la réaction kinésine-MT on peut déterminer le taux à 2D (qu'on a appelé k_b^{calc}) à partir du taux d'association à 3D, k_{on} (en $M^{-1}\text{s}^{-1}$ ou $m^3\text{s}^{-1}$), qui peut se déduire d'une mesure de constante d'affinité

⁵voir ch.4 §B.2

kinésine-MT et d'une mesure du taux de dissociation k_u^0 :

$$k_b^{calc} = \frac{\gamma k_{on} c}{d_c} \quad (5.18)$$

où γ est un facteur géométrique sans dimension (compris entre 1 et 100) qui tient compte du fait que ligands et récepteurs sont orientés de façon favorable, contrairement au cas à 3D ; c est la concentration surfacique en ligands (donc en kinésines) qu'on a prise égale à $0,1 \text{ mol}\% = 2.10^{15} \text{ moteurs}/\mu\text{m}^2$, et d_c est la taille caractéristique d'une bicouche (soit environ 10^{-8} nm). d_c est introduit lors du passage 3D-2D. Le taux d'association k_{on} est pris égal à $2,4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} = 2,3.10^{-21} \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ [Block et al., 2003]. Ce calcul donne k_b^{calc} entre 4.10^2 et 4.10^4 s^{-1} soit 2 à 4 ordres de grandeur plus grand que ce que nous avons trouvé. En effet, il a été montré de façon très claire dans [Cuvelier and Nassoy, 2004] que le taux d'attachement ligand-récepteur à 2D n'est pas une caractéristique intrinsèque du couple mais qu'il est fortement déterminé par l'accessibilité des ligands. L'utilisation dans leurs expériences de l'équation 5.18 donnait d'ailleurs un taux d'attachement à 2D 6 ordres de grandeur plus grand que ce que donnait la valeur mesurée.

A partir du taux d'attachement k_b , il est cependant possible de faire un petit calcul, qui donne juste une loi d'échelle, pour déterminer la probabilité p d'accrochage de la kinésine sur un MT quand celle-ci est située à proximité immédiate. Cette probabilité est, contrairement à k_b , une propriété intrinsèque de la kinésine-1. Il suffit pour cela d'écrire que le temps caractéristique de diffusion le long du tube de rayon R_t , sur une demi circonférence (πR_t), de façon à arriver à proximité du MT est : $\tau = (\pi R_t)^2/D$, où D le coefficient de diffusion des kinésines à la surface du tube. Alors, le taux k_b est donné en première approximation par : $k_b = (1/\tau)p$. On peut ainsi calculer $p = ((\pi R_t)^2/D)k_b \simeq 5.10^{-3}$.

Nous avons donc été en mesure de déterminer un paramètre moléculaire, le taux d'attachement de la kinésine sur un MT, qui certes dépend de la géométrie du système, mais dans une géométrie qui est proche de celle observée *in vivo*.

C.3.2 Comparaison de la longueur d'accumulation des moteurs et de la longueur correspondant aux moteurs qui tirent

Il est important de noter que la longueur caractéristique λ de croissance des densités de moteurs au bout du tube est complètement différente de la longueur correspondant aux n_b moteurs qui tirent le tube dans le "traffic jam". Par exemple, au seuil, s'il y a 5 moteurs qui tirent, ils doivent être espacés d'une distance de l'ordre de la taille d'un dimère de tubuline (8 nm) pour pouvoir se partager la force (bien entendu, les moteurs peuvent aussi être disposés sur des protofilaments parallèles). Cela signifie que, au maximum, si tous les moteurs sont alignés sur un seul protofilament, la taille correspondant à n_b est de l'ordre de 50 nm, ce qui est bien plus petit que les valeurs de λ observées (de l'ordre du micron). La longueur caractéristique λ est bien liée aux propriétés de transport des moteurs (eq. 5.16), mais est

indépendante de l'organisation des moteurs au bout du tube [Campàs et al., 2005c].

C.4 Comparaison avec les simulations

Pour mieux comprendre le rôle des fluctuations dans la distribution des moteurs le long d'un tube de membrane qui croît, nous avons aussi effectué des simulations (décrites au §B.3 et effectuées par O. Campàs) avec un seul protofilament. La figure 5.22 montre deux exemples de croissance de tube, pour deux valeurs différentes de densité surfacique de moteurs sur la vésicule et des tensions plus faibles que celles de nos expériences. La résolution temporelle a été ajustée pour correspondre à peu près à celle des expériences (2 image/s) et, comme la résolution spatiale des simulations est celle d'un site de MT (8 nm), la distribution spatiale des moteurs obtenue a été lissée de façon à ajuster cette résolution à celle des expériences (134 nm, taille d'un pixel). On peut voir fig. 5.22 que lorsque la densité de moteurs est grande (cas (B)), il y a une phase de haute densité de moteurs⁶ de la taille de quelques microns qui croît avec le temps. Ce comportement n'a pas été observé expérimentalement probablement parce que l'utilisation de trois protofilaments par les moteurs pour tirer le tube (comme nous l'avons montré au §B.3.2) évite la formation de phases de haute densité de la taille du micron (si le tube n'est pas arrêté, voir §D.1.1). Pour le même flux entrant dans le tube en provenance de la vésicule, le flux de moteurs par protofilament est alors trois fois plus petit. En même temps, la distribution des moteurs sur trois protofilaments implique que le tube est capable de croître à une vitesse plus grande. Ces deux arguments nous font penser que les simulations à 1 protofilament ne peuvent décrire complètement nos observations, et qu'il est nécessaire d'en refaire avec trois protofilaments. Ce travail est encore en cours. D'autre part, on remarque sur la figure 5.22(A) que, lorsque le flux entrant de moteurs est plus faible, l'échelle de temps pour créer une phase de haute densité est beaucoup plus grande. Deux exemples de profils de densité de moteur dans les deux cas (faible et forte densités de moteurs) sont représentés figure 5.22(C) et (D). On observe dans les deux cas la croissance exponentielle de la densité de moteurs le long du tube vers le bout. En effet, cette croissance ne dépend de l'organisation des moteurs qui tirent le tube (1 ou 3 protofilaments). On retrouve donc bien une longueur caractéristique λ de l'ordre du micron par simulation. De plus, le profil (D) fait apparaître la phase de haute densité de la taille du micron mentionnée plus haut.

Les kymographes de la figure 5.22 présentent aussi des inhomogénéités de densité de moteurs le long du tube. Le fait que nous n'observions pas ce genre de trafic aussi nettement dans les expériences (voir par exemple le kymographe figure 5.14) vient de ce que la densité des moteurs observée dans ce cas est une moyenne des densités qu'il y a sur chaque protofilament. Une fois de plus, cette remarque permet de confirmer qu'il doit y avoir plusieurs protofilaments utilisés par les moteurs pour tirer un tube.

⁶voir description au ch.3 §B.3.2

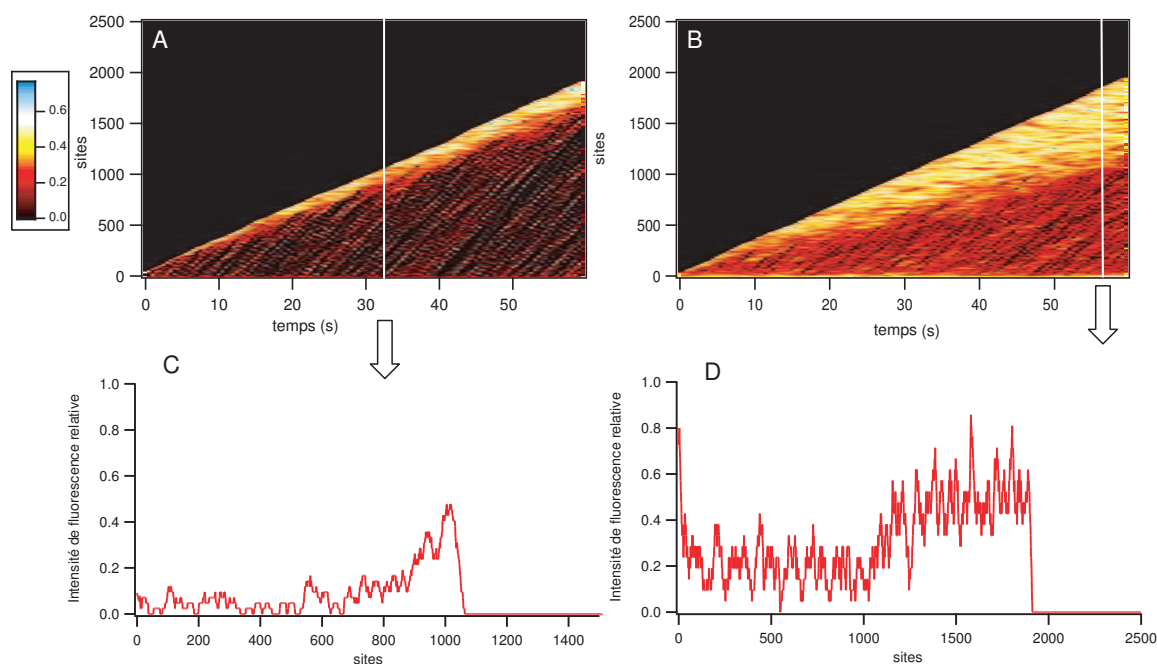


FIG. 5.22 – kymographes obtenus par simulation de croissance de tube le long d'un seul protofilament. (A) La densité surfacique de moteurs à la surface imposée est petite ($10 \text{ moteurs} / \mu\text{m}^2$) et la force est égale à 4 pN . (B) La densité surfacique est grande ($100 \text{ moteurs} / \mu\text{m}^2$), et la force est aussi de 4 pN . On remarque la formation d'une phase de haute densité de la taille du micron. (C-D) Exemples de profils de densité obtenus pour l'instant précisé par la flèche. Les densités sont normalisées par la densité maximale. (C) On observe la croissance exponentielle de la densité vers le bout du tube, qui existe déjà pour un protofilament. (D) Au bout du tube se trouve la phase de haute densité de la taille du micron. Simulations : O. Campàs.

C.5 Cas des vésicules rigides

De même que pour l'étude de l'étape de formation des tubes de membrane, nous avons aussi utilisé des vésicules rigides pour étudier la croissance de tubes de membrane. Comme nous avons vu que le coefficient de diffusion des moteurs à la surface de la membrane est du même ordre de grandeur que le coefficient de diffusion des lipides dans la membrane, on peut supposer que, dans le cas des vésicules rigides, le coefficient de diffusion des moteurs est aussi égal au coefficient de diffusion des lipides dans la phase liquide ordonnée SM/Chol 1 :1. Ce dernier a été mesuré dans [Kahya et al., 2003], et est égal à : $D_r = 0,065 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ce coefficient est 25 fois plus faible que dans le cas des vésicules EPC, ce qui signifie que la longueur caractéristique d'accumulation des moteurs λ , donnée en première approximation par $\sqrt{D/k_b}$, doit diminuer d'un facteur 5. Nous avons en effet observé expérimentalement une diminution de la longueur λ (voir par exemple le profil fig. 5.23) et des valeurs de l'ordre de $\lambda \simeq 200 \text{ nm}$, mais cette observation est difficile à quantifier, étant donnée la résolution spatiale de notre microscope.

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

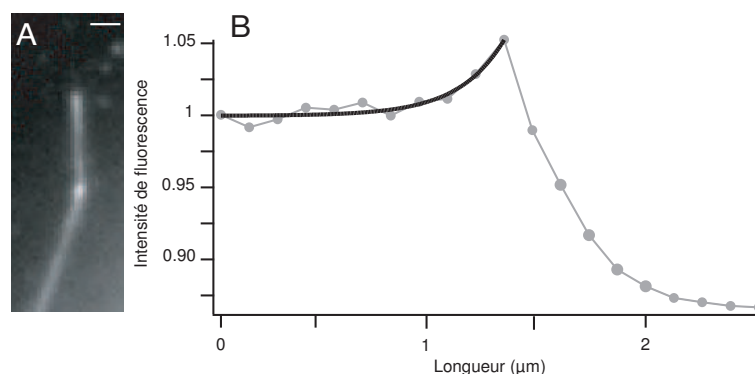


FIG. 5.23 – Accumulation de fluorescence au bout d'un tube de membrane tiré à partir d'une vésicule rigide. (A) Image du tube. Barre=1 μm . (B) profil d'intensité de fluorescence au bout du tube, normalisée par l'intensité loin du tube. Le rapport signal sur bruit est très faible dans ce cas, ce qui explique le haut niveau du signal du fond (au-delà du tube). Un ajustement exponentiel donne $\lambda \simeq 200 \text{ nm}$, soit environ 5 fois moins que dans le cas des vésicules EPC.

Dans le cas EPC, λ est typiquement de l'ordre de 6 ou 7 pixels (1 pixel=134 nm). Dans le cas des vésicules rigides, cette longueur est de l'ordre de 1 à 2 pixels, ce qui devient plus difficile à détecter et à ajuster. De plus, il est intéressant de remarquer que, comme les vésicules rigides sont imperméables, leur tension initiale peut varier beaucoup d'une vésicule à l'autre puisque la tension n'est pas fixée par la loi de Laplace. Nous avons ainsi observé différents rayons de tube de membrane (qui varie comme la racine carrée de σ , voir eq. 3.4).

L'image figure 5.24 illustre ce phénomène. Dans le cas où le rayon du tube est petit (de l'ordre du pixel), il n'est pas possible de mesurer sa taille précisément puisque la résolution est limitée par la diffraction. Les tubes tirés à partir de vésicules EPC ont aussi une taille apparente de l'ordre de 2 pixels, mais on peut calculer avec $\sigma \simeq 2.10^{-4} \text{ N/m}$ et $\kappa = 10 K_B T$, que le rayon est de l'ordre de quelques dizaines de nm (une fraction de pixel). En revanche, lorsque les tubes sont plus gros, ce qui est le cas figure 5.24, il est possible de mesurer le rayon plus précisément ($R_t = 340 \text{ nm}$ sur la figure). On en déduit alors la valeur de la tension égale à 10^{-6} N/m (pour $\kappa = 65 K_B T$).

On peut noter finalement que nous avons aussi réussi à extraire des tubes de membrane de globules rouges biotinylés (par la méthode classique de biotinylation publiée par exemple dans [Waugh et al., 2001]⁷), en utilisant le même protocole que pour les vésicules biotinylées (dans le tampon d'osmolarité 200 mOsm, les globules sont dégonflés). Comme auparavant dans le cas des vésicules rigides, la tension de membrane n'est pas contrôlée, mais connaissant la rigidité de courbure de la membrane des globules (environ $40 K_B T$ [Waugh et al., 2001]), et le rayon du tube (en-

⁷Les globules ont été biotinylés par D. Cuvelier et P. Nassoy, Institut Curie

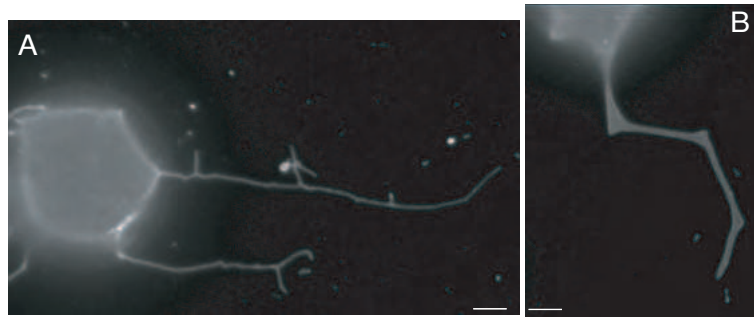


FIG. 5.24 – Images de tubes tirés de vésicules rigides pour deux tensions de membrane différentes. (A) Forte tension, R_t est inférieur à la résolution du microscope. (B) Faible tension. R_t est mesurable ($R_t=340$ nm), et il est possible de remonter à la tension de la vésicule : $\sigma=10^{-6}$ N/m (avec $\kappa=65 K_B T$). Barre= $4 \mu m$ dans les deux cas.

viron 100 nm, limite de la diffraction pour une mesure optique), il est possible de la calculer grâce à la relation 3.4 : $\sigma \simeq 4 \cdot 10^{-6}$ N/m (fig. 5.25). L'extraction du tube de globule par les kinésines n'est pourtant possible que parce que celles-ci tirent très lentement (moins de $0,1 \mu m/s$). En effet, l'existence d'un couplage entre le cytosquelette du globule et la membrane, qui détermine la viscosité apparente de celle-ci, implique que plus le tube est tiré vite, et plus la force nécessaire pour le tirer est grande [Tozeren et al., 1982]. Ainsi, si les kinésines tiraient beaucoup plus vite, elles devraient exercer une force beaucoup plus importante que la force statique F_0 , et qui serait au-dessus de la force maximale seuil pour l'extraction d'un tube. Il est difficile de quantifier ces arguments avec ce système puisque la quantité de biotines à la surface du globule n'est pas connue. Cet effet de "shear thinning" est donc illustré ici de façon qualitative.

C.6 Embouteillage de moteurs le long d'un tube de membrane

C.6.1 Inhomogénéités de fluorescence observées expérimentalement

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que nous avons été capables d'observer l'accumulation dynamique des moteurs au bout d'un tube de membrane tiré par des kinésines. Cette accumulation est bien décrite par une théorie de type champ moyen. Cependant, en plus de cette inhomogénéité de fluorescence de la taille du micron observée au bout du tube, nous avons aussi observé des inhomogénéités d'intensité de fluorescence le long du tube, qui ne correspondent pas simplement à du bruit puisqu'elles se déplacent en avant ou en arrière le long du tube. Ces inhomogénéités ont une taille beaucoup plus petite que l'accumulation exponentielle, et sont souvent à la limite de la détection. Un exemple typique de kymographe contenant ces inhomogénéités est présenté figure 5.26. On observe des inhomogénéités qui se déplacent dans le sens du tube, et d'autres, qui apparaissent lorsque le tube

C. Etude aux temps longs de la dynamique de répartition des kinésines le long d'un tube

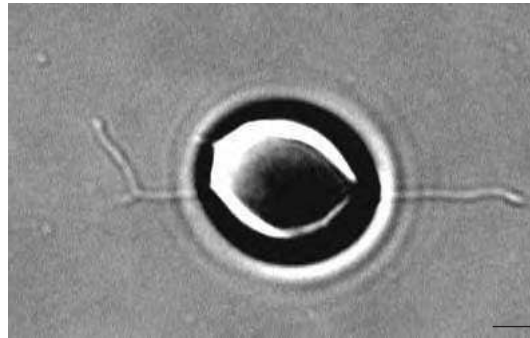


FIG. 5.25 – Image en DIC d'un tube de membrane tiré à partir d'un globule rouge biotinylé par des kinésines, avec le même protocole que dans le cas des vésicules biotinylées. A partir de la rigidité de courbure du globule ($\sim 40 K_B T$) et de la taille mesurable du rayon du tube (~ 100 nm), il est possible de calculer la tension de membrane apparente du globule : $\sigma = 4.10^{-6}$ N/m. Comme les kinésines tirent le tube très lentement ($\sim 0,1 \mu\text{m}/\text{s}$), la force nécessaire pour extraire le tube est encore accessible aux moteurs. Cette force augmente beaucoup avec la vitesse à laquelle le tube est tiré. Barre = $4 \mu\text{m}$.

s'arrête ou ralentit, et qui avancent dans le sens rétrograde. Il est encore difficile de donner une interprétation pour la forme et la cinétique de ces inhomogénéités, mais les grandes lignes du modèle que le groupe de théorie du laboratoire essaye de développer pour décrire ces embouteillages de moteurs sont données ci-dessous. Comme la théorie de champ moyen ne prévoit pas ce genre d'inhomogénéités, nous espérons que les simulations de croissance de tube effectuées le long de 3 protofilaments nous permettront de les faire apparaître.

C.6.2 Interprétation

Nous pensons que les inhomogénéités qui se déplacent vers l'extrémité du tube sont des phases de haute densité de moteurs ("traffic jams"), qui coexistent avec une phase de basse densité le long du tube et ont un temps de vie fini. Dans le cas des inhomogénéités qui bougent dans le sens contraire au mouvement du tube, nous pensons qu'elles correspondent à des ondes rétrogrades de trafic, similaires à celles observées dans les embouteillages de voitures sur une autoroute. Autrement dit, ce sont des "traffic jams" créés dans une phase de haute densité (par exemple au bout du tube lorsque la vitesse du tube diminue) qui se déplacent ensuite dans le sens rétrograde [Lighthill and Whitham, 1955]. La raison pour laquelle le "traffic jam" se déplace dans le sens rétrograde est que la vitesse de l'onde de densité dépend de la densité : elle est positive pour une densité faible et devient négative au-delà d'une certaine densité critique dont la valeur dépend du modèle. Il faut remarquer que cette explication reste hypothétique car nous n'avons pas encore réussi à quantifier ce phénomène. En fait, il faudrait étendre la théorie des "traffic jams" dans le cas où la cinétique de Langmuir est aussi présente dans le système.

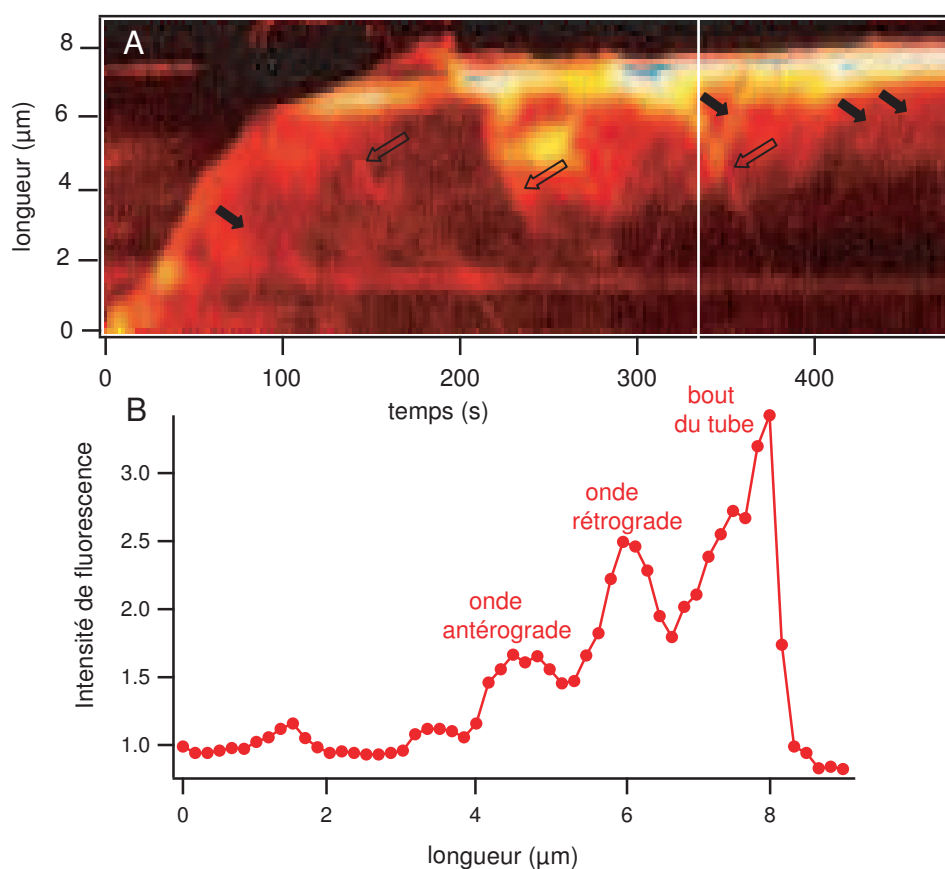


FIG. 5.26 – Inhomogénéités de fluorescence le long d'un tube de membrane. (A) Diagramme à 3D (kymographe) montrant l'intensité de fluorescence le long d'un tube de membrane (vésicule EPC, $\rho_\infty=0,1\%$) en fonction du temps (1 image/2 s). On remarque la présence d'inhomogénéités de fluorescence qui se déplacent dans le sens de croissance du tube (flèches pleines) et dans le sens inverse (flèches creuses). Ces dernières apparaissent au bout du tube lorsque celui-ci ralentit ou s'arrête. (B) Profil d'intensité de fluorescence normalisée par l'intensité loin du tube pour l'instant représenté par la ligne blanche verticale sur le kymographe. On repère la position de l'onde rétrograde, l'onde antérograde et le bout du tube.

D Etude aux temps très longs

D.1 Observations expérimentales

La partie précédente a permis de montrer que, pour des temps pas trop longs, il est possible de décrire complètement la dynamique de croissance de tube de membrane. Cependant, rien ne nous empêche d'observer les tubes de membrane aux temps très longs. L'hypothèse selon laquelle la force nécessaire pour tirer un tube est indépendante de la longueur du tube n'est alors plus valable, ce qui modifie le phénomène de croissance des tubes décrit précédemment. Nous avons ainsi observé deux types de comportement. Le premier, qui est observé dans la majorité des cas,

correspond à l'arrêt de la croissance des tubes. Le second comportement est beaucoup plus rare mais aussi plus dynamique : il correspond à l'oscillation du bout du tube. Dans les deux cas, on remarque qu'il existe une longueur maximale de tube de membrane qu'il n'est pas possible de dépasser. Cette longueur maximale correspond à une force maximale au-delà de laquelle le flux entrant de moteurs liés ne peut compenser le flux d'attachement. Nous allons d'abord détailler les observations faites dans les deux cas, puis mettre en place les bases de la théorie qui permet d'interpréter ces observations.

D.1.1 Arrêt d'un tube

Dans la plupart des "tube assays" réalisés, environ 30 minutes après l'injection des vésicules dans la chambre d'observation, tous les tubes tirés à partir de vésicules dans la chambre d'observation s'arrêtent de pousser. Cet intervalle de temps dépend beaucoup de la tension initiale imposée aux vésicules. En effet, pour des vésicules plus fluctuantes initialement, le réservoir de surface est plus important et il est possible de tirer des tubes plus longs : la période de croissance peut durer jusqu'à plusieurs heures. Ce qui signifie que la quantité d'ATP présente en solution n'est pas limitante sur 30 minutes, ni même le réchauffement des kinésines (qui se conservent bien à 4° mais se dégradent progressivement à température ambiante). Lorsque le tube s'arrête de pousser, les kinésines continuent à avancer le long du tube et s'accumuler au bout. Il se forme donc une phase de haute densité de taille macroscopique qu'il est possible d'observer au microscope. Un exemple d'embouteillage ("traffic jam") de moteurs de la taille du micron au bout d'un tube arrêté est représenté figure 5.27.

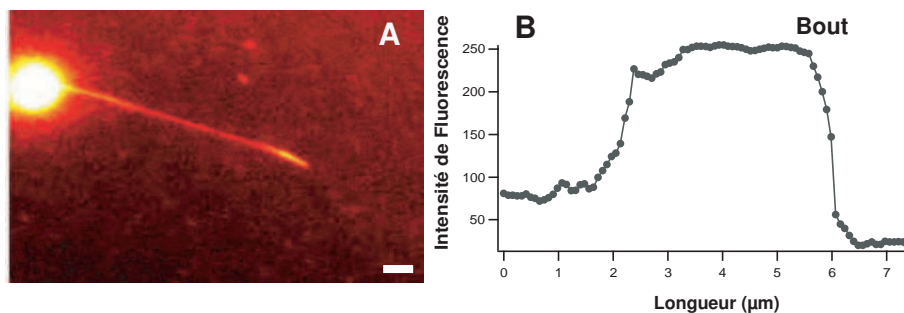


FIG. 5.27 – Embouteillage de moteurs au bout d'un tube de membrane. (A) Image d'un tube de membrane arrêté, environ 3h après l'injection de vésicules dans la chambre. Les sites d'accrochage des moteurs sont marqués en fluorescence, il est donc possible d'observer leur distribution le long du tube. On observe ainsi une grande accumulation de moteurs au bout du tube sur plusieurs microns. Image obtenue par vidéomicroscopie. Barre=2 μm . (B) Profil d'intensité de fluorescence le long du tube de l'image (A). On observe la présence de l'embouteillage (phase de haute densité). La phase de basse densité est décrite par une exponentielle.

Nous avons aussi observé dans quelques cas la dynamique d'accumulation des moteurs au bout du tube, pour former cet embouteillage de plusieurs microns. La figure 5.28(A) montre un kymographe illustrant cette accumulation macroscopique. D'abord le tube pousse, puis s'arrête après environ 250 s. On observe alors la croissance de la phase de haute densité (bleue) au bout du tube. Ce kymographe peut être mis en parallèle avec un kymographe obtenu par simulation (décrite au §B.3). Le tube simulé est tiré le long d'un protofilament, et l'augmentation de la force que doivent exercer les kinésines avec la longueur du tube est prise en compte. Ce qui explique que le tube s'arrête. La forme de croissance de la phase haute densité (bleue) ressemble beaucoup à celle observée expérimentalement. Cependant, là encore, il est nécessaire de refaire des simulations à trois protofilaments de façon à mieux décrire les expériences en obtenant des valeurs plus réalistes des paramètres, comme par exemple pour la vitesse de croissance du tube.

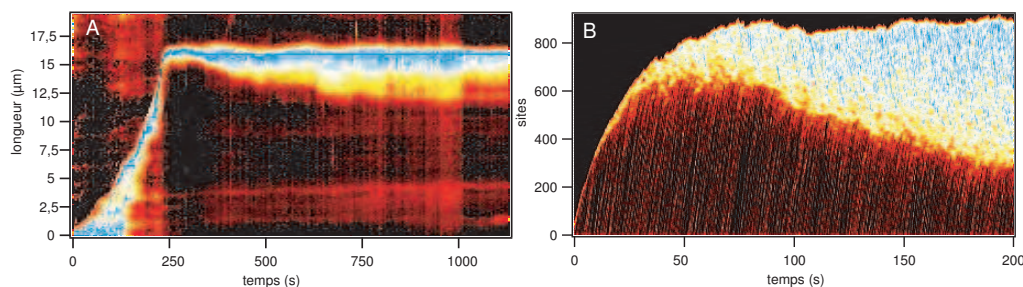


FIG. 5.28 – Dynamique de formation d'un embouteillage de moteurs macroscopiques au bout du tube. (A) Kymographe obtenu expérimentalement par analyse du profil d'intensité de fluorescence le long d'un tube observé en vidéomicroscopie, qui finit par s'arrêter. On observe la dynamique de formation de la phase de haute densité en moteurs (bleue). (B) Kymographe obtenu par simulation de la croissance d'un tube le long d'un seul protofilament, lorsque l'on tient compte de la variation de la force avec la longueur du tube (1 pN/nm). Simulation : O. Campàs.

D.1.2 Oscillations de l'extrémité du bout du tube

Pour quelques tubes observés longtemps après injection des vésicules, un autre comportement a pu être mis en évidence. Dans certains cas, les tubes ne s'arrêtent pas de pousser mais des phases de croissance et de rétraction alternent. Lorsqu'un tube a atteint une certaine longueur, il se rétracte alors très rapidement (avec une vitesse de plusieurs ordres de grandeur supérieure à la vitesse de croissance d'un tube), puis repousse à nouveau. Il a été possible d'observer jusqu'à dix oscillations successives du bout du tube. La figure 5.29 montre un exemple de séquence d'images obtenues par vidéomicroscopie illustrant ce phénomène d'oscillation du bout du tube. Cette séquence a ensuite été comparée avec les résultats obtenus par l'analyse théorique (voir plus loin). Pour observer l'oscillation des bouts du tube, il n'est pas nécessaire de marquer en fluorescence les sites d'accrochage des moteurs. Nous avons

donc utilisé un marquage non spécifique de la membrane au lipide-Texas Red (très stable et présent en grande quantité 1%, comparé au 0,1% de DSPE-Rhod-Biot), qui permet d'observer les vésicules en continu (avec une cadence de 25 images/s en utilisant une caméra CCD) sans avoir trop de problèmes liés au photoblanchiment.

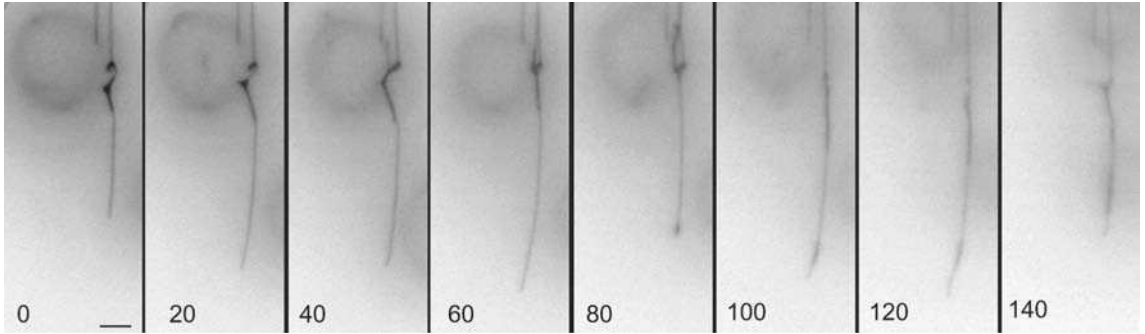


FIG. 5.29 – Séquence d'images d'un tube de membrane tiré à partir d'une vésicule dont les sites d'accrochage des moteurs ne sont pas marqués de façon spécifique. La vésicule contient 0,1% de lipides biotinylés et 1% de lipide-Texas Red. La séquence montre une image toutes les 20 secondes. Le contraste des images est inversé. Barre=3 μm .

D.2 Analyse théorique

D.2.1 Equations décrivant le système dynamique

Aux temps très longs (correspondant à des tubes de longueurs supérieures à 10 μm), nous ne pouvons plus négliger la variation de la force avec la longueur du tube. La variation de la force F avec la longueur du tube L (pour une vésicule dans le régime entropique) est donnée par l'équation (voir ch.3 §A.3.3 et l'équation 3.13) :

$$\frac{L}{L_0} = 2 \frac{F}{F_0} \ln \left(\frac{F}{F_0} \right) \quad (5.19)$$

où $L_0 = (K_B T / 8\pi\kappa)(2R^2/R_0)$, R étant le rayon de la vésicule, R_0 le rayon du tube ($R_0 = \sqrt{\kappa/2\sigma_0}$), σ_0 la tension initiale de la vésicule correspondant à la force initiale F_0 ($F_0 = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma_0}$). Le terme de compressibilité est négligé dans le régime entropique⁸.

Dans ce cas, comme la force augmente avec la longueur et comme la cinétique des moteurs est beaucoup plus rapide que l'échelle de temps de croissance du tube, le nombre de moteurs au bout du tube s'adapte à chaque instant à la force imposée par la membrane. Le nombre de moteurs qui tirent le tube diminue donc quand la force augmente (voir le diagramme de phase fig. 3.19, quand la force augmente, ν

⁸voir ch.2 §C.3.1

Chapitre 5. Etude expérimentale de l'extraction et de la croissance de tubes de membrane : Comparaison avec la théorie

augmente). Il existe une longueur au-delà de laquelle, dans certaines conditions, tous les moteurs au bout du tube se détachent simultanément car ils ne sont plus assez nombreux pour maintenir le tube. Alors, celui-ci se rétracte jusqu'à une certaine longueur pour laquelle la force est assez petite pour qu'il y ait assez de moteurs pour tirer. Cette alternance de croissances et de rétractions du tube correspond aux oscillations que nous avons observées expérimentalement. Nous allons voir qu'il est possible de décrire de façon théorique les deux régimes observés aux temps très longs : le régime où les tubes s'arrêtent de pousser mais sont stables et le régime où l'extrémité du tube oscille. Cette étude théorique a été effectuée par O. Campàs dans le groupe de théorie du laboratoire.

Pour cela, il faut introduire un nouveau coefficient dans les équations du mouvement du tube décrite au chapitre 3, qui est le coefficient de friction ξ . Nous pouvons négliger jusqu'ici le terme de friction parce que la contribution de ξV était petite pour les tubes tirés par des kinésines par rapport aux autres forces. Comme ce n'est plus vrai lorsque les tubes se rétractent (puisque nous avons vu que la vitesse de rétraction des tubes peut avoir plusieurs ordres de grandeur de plus que la vitesse des kinésines), il faut réécrire le bilan des forces. Les autres équations restent identiques à ce que l'on avait vu précédemment. On peut les rappeler ici :

1/ Le bilan des forces au bout du tube s'écrit :

$$\xi(x)\dot{x} = F_M - F(x) \quad (5.20)$$

où F_M est la force exercée par les moteurs liés au bout du tube et $F(x)$ est la force de rappel exercée par la membrane pour un tube de longueur x . L'axe des x est alors centré sur le début du tube et est orienté dans le sens de croissance du tube.

2/ La vitesse des moteurs liés au bout du tube, qui se partagent toujours la force F_M , est égale à $V = \dot{x}$ et s'exprime toujours de la façon suivante (voir eq. 3.21) :

$$V = V_0 \left(1 - \frac{F_M}{F_S n_b} \right) \quad (5.21)$$

3/ La cinétique des moteurs liés n_b s'écrit encore (voir eq. 3.22) :

$$\frac{dn_b}{dt} = J_b(n_b, x) - k_u(n_b)n_b \quad (5.22)$$

où $k_u(n_b)$ est donnée par l'équation de Kramers 2.4 et J_b est le flux entrant de moteurs liés dans le référentiel du bout du tube : $J_b = \rho_b(V_0 - \dot{x})$ (ρ_b est la densité de moteurs liés au bout du tube, on a $\rho_b \simeq 2\pi R_0 \rho_\infty$).

Si maintenant on définit :

$$f \equiv \frac{F_S a}{K_B T} \quad (5.23)$$

$$n_\xi \equiv \frac{\xi V_0}{F_S} \quad (5.24)$$

alors on obtient un système dynamique à deux dimensions décrit par :

$$\dot{n}_b = J_b(n_b, x) - k_u^0 \exp\left(f \frac{\frac{F(x)}{F_S} + n_\xi}{n_b + n_\xi}\right) n_b \quad (5.25)$$

$$\dot{x} = V_0 \frac{n_b - \frac{F(x)}{F_S}}{n_b + n_\xi} \quad (5.26)$$

De façon très générale, dans le système dynamique décrit par les équations précédentes, il existe seulement deux régimes dynamiques différents. Soit il y a des états stables où le tube garde une longueur constante parce qu'il s'arrête de pousser, soit il y a des états oscillatoires. Suivant la valeur des paramètres, le système est dans l'un ou l'autre des régimes. Les paramètres qui vont jouer un rôle important pour déterminer le régime sont :

- f , qui est une caractéristique du moteur moléculaire utilisé
- ξ , dont l'origine physique est encore discutée (voir ci-dessous)
- R , le rayon initial de la vésicule, qui apparaît lorsque l'on écrit la variation de la force $F(x)$ avec la longueur du tube (voir équation 5.19 dans l'expression de L_0)
- ρ_∞ , la densité surfacique de moteur, qui nous l'avons vu, jouait déjà un rôle important dans la description du seuil d'existence de tubes de membrane.

Le terme de friction peut avoir différentes origines : la friction hydrodynamique (qui fait intervenir entre autres la viscosité du milieu environnant et la longueur du tube L), la friction entre les couches de la membrane (voir [Evans and Yeung, 1994]) et la friction venant des moteurs (friction indépendante de la longueur du tube mais qui fait intervenir la densité de moteurs ρ_∞). Suivant la description adoptée pour la friction, le diagramme de phase décrivant les deux régimes (stable/oscillant) sera différent (voir un exemple au §D.2.3), ce travail reste encore en cours.

D.2.2 Intégration numérique

En utilisant une friction constante, il est possible de trouver des valeurs pour les paramètres f , ξ , R et ρ_∞ de façon à décrire l'oscillation du bout du tube observée expérimentalement et présentée au paragraphe D.1.2 (voir figure 5.30(A), $R=2,5 \mu m$; $f=2,5$; $\rho_\infty=1000$ moteurs/ μm^2 et $\xi=4,5 \cdot 10^{-8}$ N s/m). L'intégration numérique du système dynamique avec ces paramètres donne la courbe figure 5.30(B), qui ressemble beaucoup à la courbe expérimentale. La figure 5.30(C) montre, de plus, la variation du nombre de moteurs qui tirent le tube en fonction du temps ; on retrouve le fait que le nombre de moteurs qui tirent le tube finisse par saturer avant qu'ils ne se détachent tous. Cependant, la comparaison théorie/expérience reste encore qualitative.

D.2.3 Diagrammes de phases

En utilisant une friction hydrodynamique, dont l'expression est donnée par l'équation 5.27, il est possible de tracer le diagramme de phase décrivant les dif-

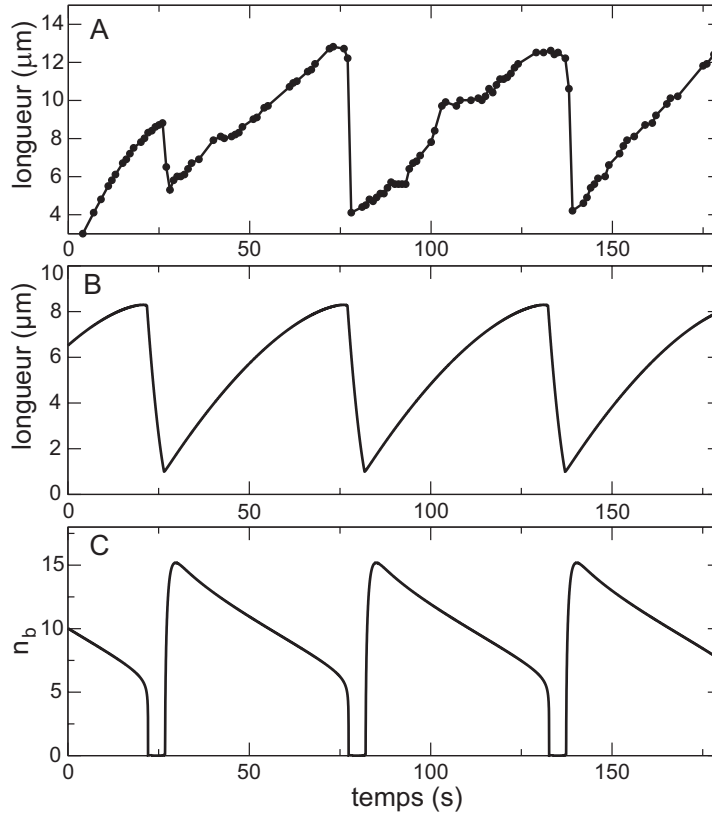


FIG. 5.30 – Comparaison théorie/expérience décrivant l'oscillation d'un bout de tube. Les paramètres utilisés sont : $R=2,5 \mu m$, $f=2,5$, $\rho_\infty=1000$ moteurs/ μm^2 et $\xi=4,5 \cdot 10^{-8}$ N s/m. (A) Courbe expérimentale donnant la longueur du tube en fonction du temps. (B) Courbe obtenue par résolution numérique du système dynamique donnant la longueur du tube en fonction du temps. (C) Nombre de moteurs qui tirent le tube en fonction du temps, obtenu aussi par résolution numérique.

férents régimes d'un tube de membrane. Ce diagramme est représenté figure 5.31 pour trois valeurs de f , en fonction d'une variable proportionnelle au carré du rayon de la vésicule R et de l'inverse de ρ_∞ normalisée par la valeur minimale au seuil.

$$\xi(x) \simeq 2\pi\eta \frac{V_0}{k_u^0} x \quad (5.27)$$

où η est la viscosité du fluide environnant, x la longueur du tube, et R_t le rayon du tube de longueur x .

On remarque tout d'abord que, lorsque ρ_∞ est plus petit que la valeur seuil ρ_∞^{min} , aucun tube n'existe. Cette partie du diagramme correspond à la description du seuil de formation de tubes de membrane que nous avons détaillée dans cette thèse. De plus, lorsque que f est strictement plus petit que deux, aucun régime oscillant n'est observé. Ceci est d'ailleurs vrai quelle que soit la description de la friction adoptée. Ceci suggère que f est nécessairement plus grand que 2 puisque nous avons observé

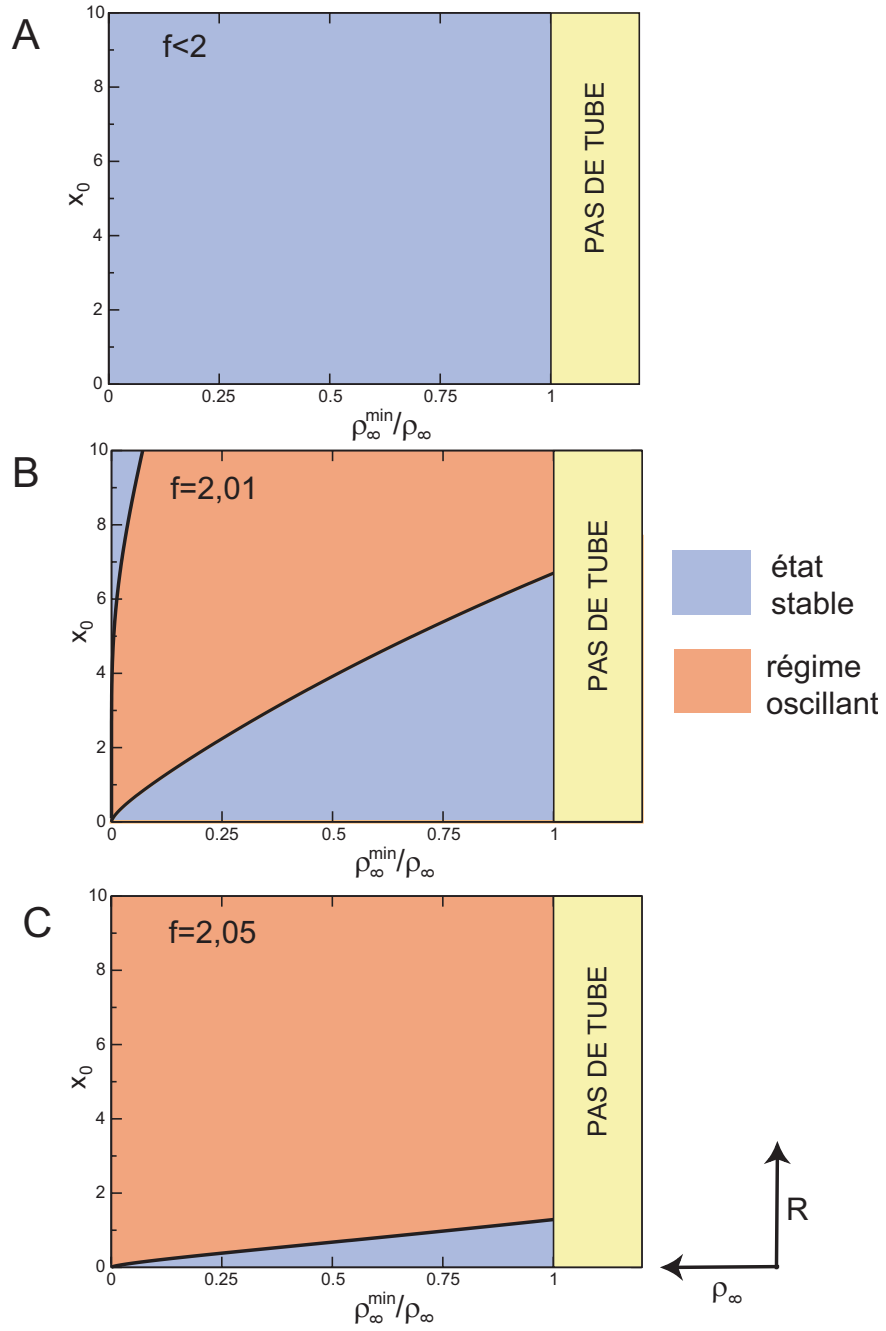


FIG. 5.31 – Diagramme de phase décrivant les deux régimes possibles pour un tube tiré aux temps très longs, en fonction de l'inverse de ρ_∞ et x_0 . x_0 dépend directement du rayon de la vésicule R ($x_0 = \frac{K_B T}{8\pi\kappa} \frac{R^2 F_0}{\pi\kappa} \frac{k_u^0}{V_0}$). Les trois diagrammes sont tracés pour trois valeurs différentes de f : (A) $f < 2$. (B) $f = 2,01$. (C) $f = 2,05$. On remarque que pour $f < 2$, il n'y a pas de régime oscillant, et que plus f augmente, plus le domaine d'oscillations s'étend. Ces diagrammes ont été calculés par O. Campàs en utilisant une friction hydrodynamique.

des oscillations de bout de tube expérimentalement. On remarque, de plus, que plus f est grand, plus la zone de régime oscillant est étendue. Comme nous avons déterminé expérimentalement que la proportion de tubes oscillants par rapport aux tubes arrêtés est très faible, nous pouvons penser que f est très proche de 2, mais par valeur supérieure. Cette information sur la kinésine que nous avons utilisée est ainsi beaucoup plus précise que ce que nous avons à notre disposition grâce à des mesures expérimentales de F_S et a ($F_S a / K_B T = 1,95 \pm 0,2$). Il est finalement important de remarquer que nos expériences sur les oscillations de bout de tubes sont parmi les premières à montrer des oscillations collectives de moteurs moléculaires processifs.

D.2.4 Remarque sur le seuil de formation d'un tube

Maintenant que nous avons une information plus précise sur la valeur de f , il est possible de revenir sur la description du seuil de formation d'un tube de membrane décrite notamment au paragraphe B.3.5. Nous avons vu qu'il y avait deux critères pour extraire un tube. Le premier critère exprime le fait qu'il y a conservation du flux de moteurs au bout du tube. C'est ce critère qui nous a permis de déterminer les expressions de densité surfacique de moteurs et la tension de membrane au seuil, ainsi que le nombre de moteurs qui tirent au seuil qu'on a trouvé égal à : $n_b^S = F_0 a / 2 K_B T$ (voir eq. 3.45).

Le second critère correspond au fait que la vitesse d'extraction d'un tube au seuil doit être positive. Ce critère permet aussi de déterminer un nombre de moteurs qui tirent au seuil. Sachant que $V = V_0(1 - F_0 / F_S n_b)$ (eq. 3.21), on trouve : $n_b^S = F_0 / F_S$. Avec les valeurs de F_0 , F_S et a , on obtient deux valeurs de n_b^S similaires (environ 5 moteurs), bien que la description du seuil soit différente. Cependant, le second critère prédomine si $(F_0 / F_S) > (F_0 a / 2 K_B T)$. Cette inégalité impliquerait que $f = F_S a / K_B T$ est strictement plus petit que 2. Or, nous venons de voir que f est probablement plus grand que 2 puisque nous avons été capable d'observer des oscillations de l'extrémité de bouts de tube [Campàs et al., 2005b]. On vérifie ainsi que le critère $V \geq 0$ n'est pas restrictif pour la détermination du nombre de moteurs qui tirent au seuil. L'incertitude sur la définition du seuil dans [Leduc et al., 2004] a ainsi été levée.

Pour finir, on peut remarquer qu'il serait intéressant de refaire la même étude (théorique et expérimentale) avec un moteur moléculaire différent, avec des constantes physiques différentes pour se placer dans un cas où $F_S a / K_B T$ est différent de 2.

Conclusion et perspectives

Faisant suite au travail effectué par A. Roux et al. [Roux et al., 2002] à l'Institut Curie, et parallèlement par G. Koster et M. Von Duijn dans le groupe de M. Dogterom à Amsterdam [Koster et al., 2003], mon travail de thèse a consisté à améliorer la préparation du système minimal existant, qui permet de reproduire *in vitro* la formation de tubes de membrane avec des éléments purifiés ou artificiels (kinésines, microtubules et vésicules), de façon à faire une étude quantitative de l'influence des différents paramètres physiques impliqués. La comparaison des résultats expérimentaux avec ceux obtenus grâce à une analyse théorique du système, effectuée par O. Campàs dans le groupe de théorie du laboratoire, a permis de caractériser de façon complète les étapes de formation, de croissance et d'arrêt des tubes de membrane.

En ce qui concerne l'étape de formation des tubes, nous avons montré que, pour des vésicules de composition lipidique donnée, les deux paramètres qui déterminent l'existence d'un tube sont la tension de membrane de la vésicule et la concentration de kinésines présentes initialement à sa surface. La variation systématique de ces deux paramètres a permis de mettre en évidence une tension maximale seuil, pour une concentration surfacique donnée, et inversement, un concentration surfacique minimale seuil pour une tension donnée. Ces deux seuils sont en fait deux aspects du même problème et ils sont liés par une relation qui ne fait intervenir que les caractéristiques physiques et biochimiques du moteur moléculaire utilisé. L'intérêt de ces résultats d'un point de vue biologique réside dans le fait que la formation d'un intermédiaire de transport, dans la cellule, peut être non seulement régulée en ajustant la nombre de moteurs, mais également peut dépendre d'un paramètre physique, la tension de la membrane. Il est intéressant de noter que la formation des tubes ne dépend pas seulement des paramètres locaux moléculaires et de la présence de protéines adaptées, mais aussi d'un paramètre non local supramoléculaire. On peut donc penser que le contrôle de ces paramètres *in vivo* pourrait intervenir dans la régulation de la formation d'intermédiaires de transport dans le trafic intracellulaire, comme nous l'avons vu dans quelques exemples au chapitre 1. Cependant, il reste à comprendre comment la cellule parvient à réguler ces deux paramètres, en particulier la tension.

Cette étude aux temps courts nous a aussi permis de déterminer le nombre minimum de moteurs nécessaires pour tirer un tube (de l'ordre de 5 pour une tension de 2.10^{-4} N/m), ainsi que la variation du nombre de moteurs qui tirent (au seuil

et loin du seuil) en fonction des paramètres importants (tension et concentration surfacique de moteurs). Une comparaison avec des simulations a montré que les moteurs sont probablement disposés sur trois protofilaments en parallèle. Les faibles nombres obtenus sont en accord avec l'idée que l'on a des moteurs processifs, capables de transporter un cargo sur de très longues distances dans une cellule de façon efficace. Une extension possible de ce travail serait de refaire toute cette caractérisation du seuil avec un autre moteur qui a des caractéristiques physiques complètement différentes (comme le Ncd par exemple, qui est un moteur non processif qui se déplace vers l'extrémité "-" des microtubules). La comparaison entre les différents moteurs pourrait permettre de mieux comprendre le lien entre les propriétés individuelles des moteurs et leur comportement collectif.

L'étude de l'étape de croissance des tubes, pour des temps pas trop longs après leur formation (typiquement quelques minutes), a permis de comprendre comment les moteurs moléculaires sont capables de s'associer pour tirer les tubes. Nous avons observé que les moteurs s'accumulent de façon dynamique au bout du tube, et qu'ils forment des phases de haute densité, le long du tube, comparables aux embouteillages de voitures observables sur route encombrée. Cette accumulation dynamique avait été prédite de façon qualitative par le groupe de M. Dogterom, nous l'avons caractérisée ici de façon complète et quantitative, ce qui nous a permis de déterminer un paramètre moléculaire : le taux d'attachement des kinésines sur un microtubule. Ce paramètre n'est pas une caractéristique intrinsèque du moteur utilisé puisqu'il dépend de la géométrie du système utilisé. Cependant, la géométrie des tubes de membrane qui nous ont servis de base d'étude est proche de celle des intermédiaires de transport intracellulaire, cette mesure *in vitro* peut donc servir de base de comparaison pour des futures études effectuées *in vivo* dans des conditions moins contrôlées. De plus, le fait que les moteurs se concentrent de façon dynamique pour tirer un tube *in vitro* nous laisse penser que, *in vivo*, il n'est pas nécessaire d'avoir une pré-association des moteurs (par exemple dans des microdomaines lipidiques, les "rafts" ou des domaines protéiques tels que les manteaux) pour les concentrer. La complexité des mécanismes d'accrochage des moteurs à la membrane doit probablement correspondre à différentes possibilités de régulation du trafic par la cellule. Il serait d'autre part intéressant, au vue de nos résultats sur les trafics de moteurs le long d'un tube, d'analyser les mouvements de moteurs observés qui ont pu être observés *in vivo* [Busch and Brunner, 2004].

L'étude de la croissance des tubes de membrane aux temps très longs nous a enfin permis de mettre évidence un phénomène très intéressant : des oscillations liées au comportement collectif de moteurs processifs. Même si ces observations ont été produites dans des conditions qui s'éloignent des conditions *in vivo* (les intermédiaires de transports *in vivo* n'ont jamais mis plusieurs heures pour relier deux compartiments d'une même cellule), elles ont cependant permis de montrer que les moteurs processifs pouvaient potentiellement avoir de tels comportements oscillants. Cette propriété est générale et devrait se manifester dans d'autres systèmes où des moteurs ou des molécules sont susceptibles de s'associer dynami-

quement puis de se détacher toutes ensembles quand elles sont soumises à une force trop importante. Un exemple serait celui des oscillations du centrosome lors de la mitose de *C. Elegans* [Grill et al., 2003]. L'analyse quantitative des phénomènes d'oscillations, qui est possible grâce à notre système, pourra peut-être donner des bases pour la compréhension d'autres phénomènes d'oscillations qui sont peut-être observés *in vivo* mais qui sont encore très mal compris.

Maintenant que ce système minimal permettant la formation de tubes de membrane est compris de façon complète (ce qui constituait déjà un défi), de nouveaux développements sont envisageables et parfois même déjà en cours. Le premier est de complexifier le système en ajoutant d'autres composants impliqués dans le transport, de façon à observer comment ces nouveaux composants modifient la formation et la croissance des tubes. Il est possible par exemple d'ajouter des protéines de manteau (comme les protéines COP-1), qui, nous l'avons vu, peuvent jouer un rôle dans la déformation de la membrane lors de la formation d'un bourgeon et dans la régulation du trafic de membrane, ainsi que les protéines qui sont *a priori* nécessaires à l'assemblage de COP-1. L'influence de la présence de ces protéines sur le seuil recensé précédemment, puis sur la distribution des moteurs au bout du tube pourra être étudiée. D'autre part, si on fixe les moteurs aux protéines COP-1 (par biotinylation par exemple), il sera très intéressant de coupler la stabilité des tubes à l'assemblage/désassemblage des manteaux. Il sera peut-être ainsi possible de décrypter pas à pas un des mécanismes impliqués dans la formation d'intermédiaires de transport. Jean-Baptiste Manneville à l'Institut Curie y travaille d'ailleurs. Une deuxième possibilité, pour complexifier le système, serait de coupler la formation de tubes par des kinésines le long de microtubules au système actine-myosine. Il est en effet possible qu'un des rôles de certaines myosines *in vivo* soit de faire varier la tension de membrane des compartiments, ce qui pourrait avoir aussi des conséquences sur le contrôle de la formation de tubes de membrane.

La deuxième voie envisagée en continuité avec ce travail est de tirer des tubes *in vivo*, en utilisant le réseau de microtubules et les compartiments des cellules mais en utilisant des kinésines purifiées qui pourront s'attacher spécifiquement à certaines protéines présentes dans les compartiments (grâce à un prétraitement des cellules utilisées). Cette étude initiée par Franck Perez (à l'Institut Curie) est déjà en cours et a pour but de mieux comprendre quels composants sont impliqués dans la tubulation et le tri de protéines et de lipides *in vivo*. L'idéal serait de pouvoir faire une étude quantitative des paramètres physiques impliqués dans le transport, comme nous l'avons fait *in vitro* dans une cellule vivante.

Pour finir, on peut remarquer que l'étude du trafic de moteurs moléculaires peut avoir, à plus long terme, un intérêt dans la recherche médicale. En effet, beaucoup de maladies sont maintenues connues comme étant liées à un défaut dans le transport de certains composants ou agents pathogènes, impliquant des moteurs moléculaires [Mandelkow and Mandelkow, 2002]. La figure 5.32 montre un exemple de dérégulation du trafic de membrane dans un neurone, mimant ce qui arrive lors de la maladie d'Alzheimer.

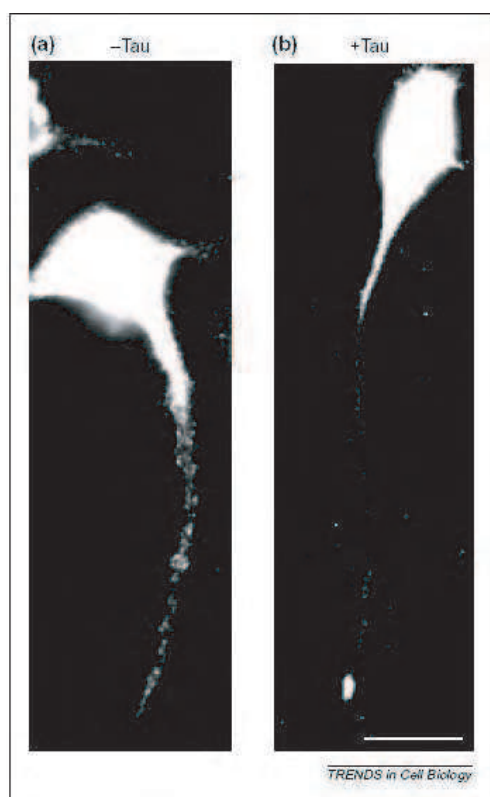


FIG. 5.32 – Rôle de la protéine tau (MAP connue pour s'agréger dans des enchevêtrements de neurobrilles dans la maladie d'Alzheimer) dans le trafic de membrane le long d'axones. (a) Cellule de neurone montrant le transport de petites vésicules tirées par des kinésines le long de MT s. La protéine APP est marquée en fluorescence; elle est connue pour être un récepteur situé sur les cargos pouvant interagir avec les chaînes légères de la kinésine (voir ch.1 §A.4.2.). (b) Cellule du même type qu'au (a), mais dont la quantité de protéines taus est fortement augmentée (ici par transfection). On remarque que le trafic de membrane est complètement bloqué dans le corps et au bout du neurone, là où la protéine APP est accumulée. Le même genre d'effet est observé lorsque l'action de la kinésine est bloquée ou lorsque interaction moteur-cargo est bloquée. Barre=10 μm . D'après [Mandelkow and Mandelkow, 2002].

Annexe A

Les lipides

La figure A.2 résume la nomenclature de classification de quelques grandes familles de lipides.

La figure A.1 donne l'évolution de la température de transition de phase de lipides saturés quand la longueur de chaîne augmente, pour trois type des têtes différentes : PE, PS et PC.

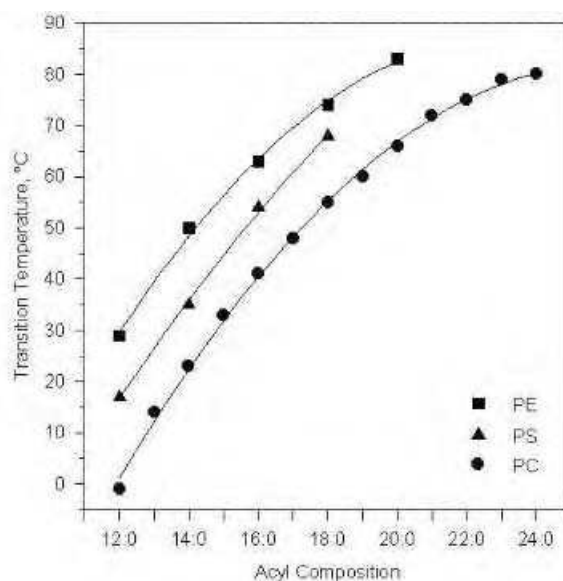


FIG. A.1 – Température de transition de phases de lipides saturés avec trois têtes différentes : PE, PS et PC (voir site internet www.avanti.com).

Quand le nombre d'insaturation augmente, la température de transition de phase chute en dessous de zéro. Par exemple :

- C16 :1 PC -36°C
- C18 :1c9 PC -20°C
- C18 :1t9 PC 12°C
- C18 :1c6 PC 1°C

Annexe A. Les lipides

- C18 :2 PC -53°C
- C18 :3 PC -60°C

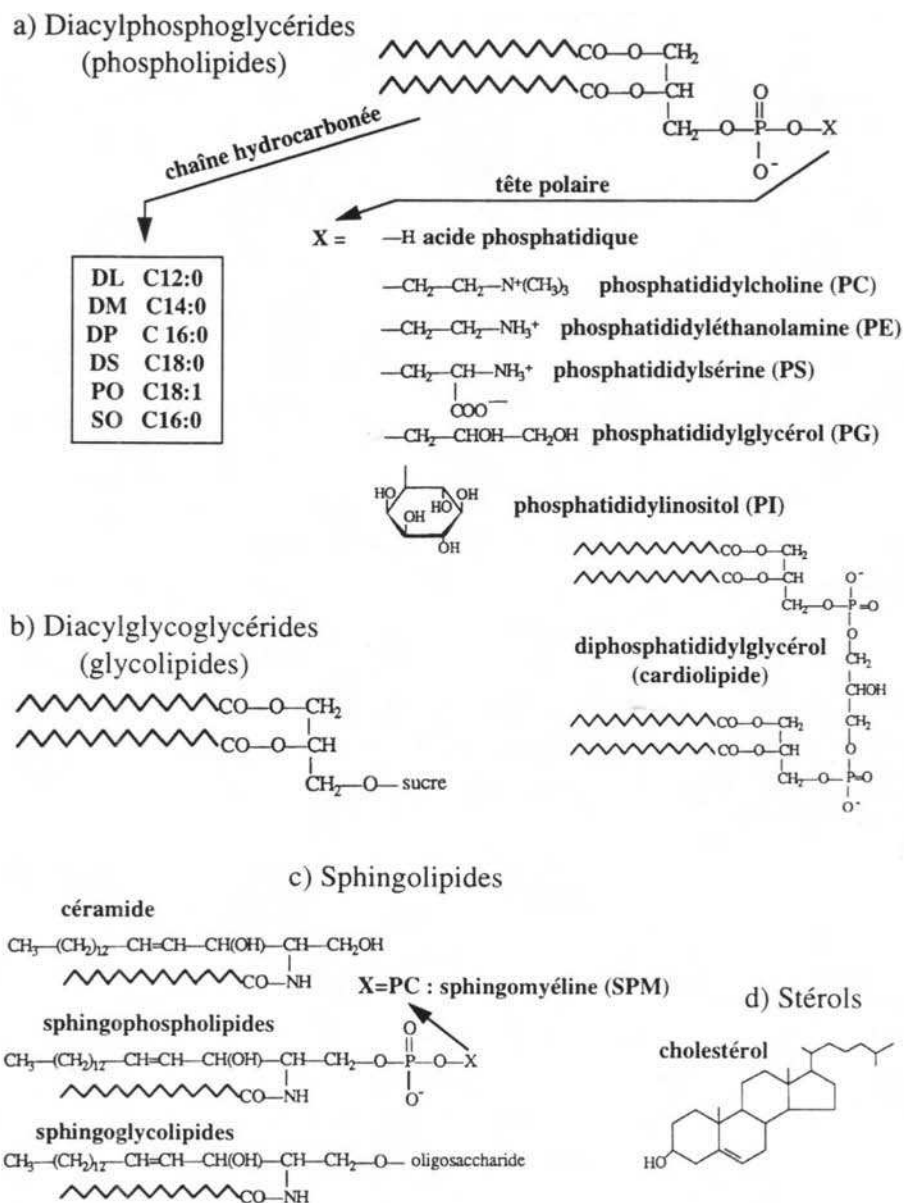


FIG. A.2 – (a) Phosphoglycériques (phospholipides) ; (b) Diacylglycoglycérider (glycolipides) ; (c) Sphingolipides ; (d) Stérols. La notation classique Cn :m permet de décrire le nombre de carbone dans la chaîne aliphatique et le nombre d'insaturations par chaîne m. On remarque la présence des différentes sortes de têtes citées dans le texte ch.2 C.1, d'après [Shechter, 1993].

Annexe B

Influence de la présence de moteurs moléculaires le long des microtubules dans un "bead assay"

Pour déterminer l'influence de la présence de kinésines le long des MTs sur la vitesse des billes lors de "bead assays", nous avons comparé l'histogramme des vitesses que nous avons obtenu dans le cas normal (avec des kinésines seulement attachées aux billes, voir fig. 4.12(A)) à l'histogramme obtenu lorsqu'il y a, en plus, des kinésines libres en solution qui peuvent s'accrocher aux MTs. Pour obtenir ce second histogramme, nous avons utilisé le protocole de "bead assays" présenté au ch.4 B.1 en ajoutant un étape supplémentaire : l'incubation des MTs avec un mélange kinésines-streptavidines.

1. Préparation d'une lamelle recouverte de MTs
2. Préincubation des billes-streptavidine avec des kinésines introduites en défaut par rapport au nombre de sites de streptavidine sur les billes
3. Préincubation de kinésines avec un large excès de streptavidines (rapport 1 :10)
4. Injection des complexes kinésines-streptavidines. Incubation 10 minutes
5. Rinçage de la chambre de façon à enlever le large excès de streptavidine
6. Injection des billes recouvertes de kinésines avec du MB

Les étapes 3-4-5 sont similaires à celles effectuées lors des "tube assays". Elles permettent de saturer les MTs avec des kinésines en l'absence d'ATP et de bloquer le site d'accrochage des kinésines avec de la streptavidine. Lorsque l'ATP est ajouté à la dernière étape, les kinésines liées aux MTs peuvent se détacher, mais comme leur site de biotine est bloqué, elles ne peuvent pas s'accrocher aux billes. Elles restent donc soit en solution, soit liées aux MTs. Les résultats obtenus pour les vitesses moyennes de billes sont représentés figure B.1 (barres pleines roses).

On remarque fig. B.1 que l'histogramme des vitesses dans le cas où les MTs sont encombrés par des kinésines est plus large que dans le cas où les MTs sont "nus". Nous pensons que la dispersion des vitesses est plus grande à cause de la présence d'embouteillages de kinésines le long des MTs, qui modifient la vitesse

Annexe B. Influence de la présence de moteurs moléculaires le long des microtubules dans un "bead assay"

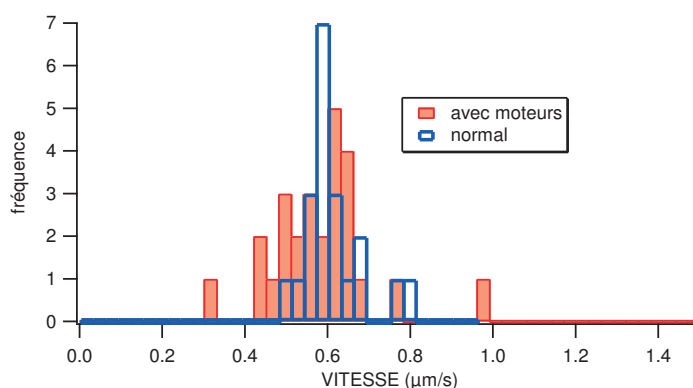


FIG. B.1 – Histogramme de vitesses moyennes obtenues par "bead assays" dans deux cas différents. Barres creuses bleues : lorsqu'il n'y a pas de kinésines libres en solution. Barres pleines roses : lorsqu'il y a des kinésines libres en solution et liées aux MTs.

des billes. Le présence de ces embouteillages peut être révélée en utilisant de la streptavidine fluorescente (Cy3) pour marquer les kinésines libres (dans l'étape 3). Dans ce cas, après l'étape 4 de rinçage, le réseau de MTs a l'allure figure B.2(A). Il est saturé de kinésines marquées en fluorescence. Après l'étape 5 et l'introduction d'ATP, les kinésines passent en solution et se détachent des MTs (B.2(B)). On observe la formation d'embouteillages le long des MTs formés de phases de haute densité de kinésines. Ces embouteillages se déplacent vers les extrémités des MTs.

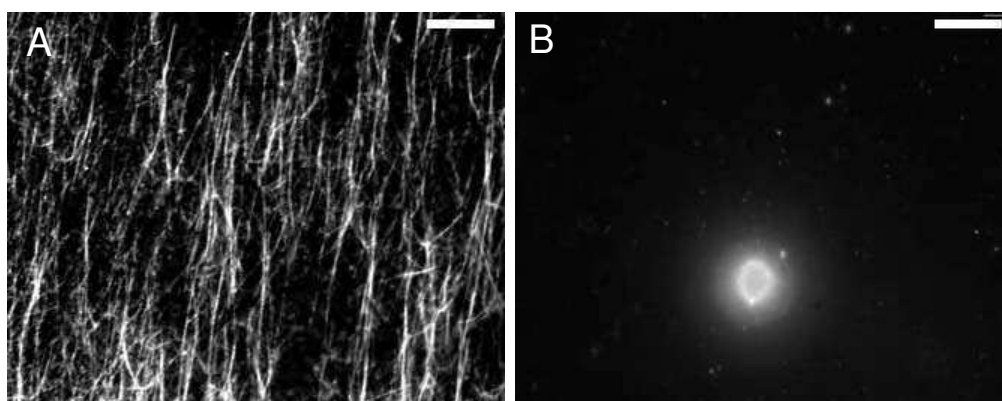


FIG. B.2 – Images obtenues en vidéomicroscopie d'un réseau de MT recouvert de kinésines marquées avec de la streptavidine-Cy3. (A) En l'absence d'ATP, les MTs sont saturés en kinésines. (B) En présence d'ATP, les kinésines avancent le long des MTs et se détachent. On observe la formation d'embouteillages de kinésines le long des MTs. Barre=10 μm .

Ce phénomène est une autre manifestation de comportement collectif de moteurs moléculaires.

Annexe C

Purification de la kinésine

TRANSFORMATION OF CELLS, day 1

Work in a sterile environment.

- BL21 cells (-80°, Aurelien's box). Let them get warm at 4°.
- DNA (-20°, room with powders etc., Aurelien's box number 1). HAK (2000) is written on the top of the eppendorf tube.
- 2 Petri boxes with ampicillin (cold room).

i/ In a 10mL sterile tube, add 50 μ L of competent BL 21 cells with 1 μ L of DNA.

ii/ 30 minutes on ice.

iii/ 45 s at 42°.

iv/ 2 min on ice.

v/ Add 1mL of LB.

vi/ Shake at 37° for 40 min (200 RPM).

vii/ Put a few beads (diameter : 1 mm) in each petri box with 100 μ L of cells. Agitate slowly for 5 s.

viii/ 37° over night, put the petri boxes at 4° around 9 o'clock the day after.

PROTEIN EXPRESSION, day 2 and 3

Work in a sterile environment.

i/ At 6PM (day 2), select a single colony. Mix with 30mL of LB and 30 μ L ampicillin (1/1000, -20°) in a 500 mL erlenmeyer. Shake at 37° over night.

ii/ At 9AM (day 3), dilute 10 mL of o/n culture into 1L LB, with 1 mL ampicillin in a 3L erlenmeyer. (X2)

iii/ Shake at 37° (200 RPM) for 2h30 until the optical density at 600 nm reaches 0.5.

iv/ Cool down the cells to 28° in water-bath (check with thermometer).

v/ Add 30 mg/L d-biotin and 24 mg/L IPTG.

vi/ 6h at 27°, shake at 200 RPM.

vii/ Centrifuge 20 min at 6500 RPM, 4°, rotor TLA 9.100.

viii/ On ice, resuspend cells in 15 mL lysis buffer (X2).

ix/ Freeze in a 50 mL falcon with liquid nitrogen.

Annexe C. Purification de la kinésine

PREPARATION, day 3

- Make 0.5 L Wash Buffer, 0.5 L HQ 50, 100 mL HQ 500 and 2L Storage Buffer with 20% glycerol.
- Reserve the ultra-centrifuge.
- Use 2.5 mL **Promega softlink monomeric avidin resin** in a 50 mL falcon, keep it at 4°. First time only : *saturation of irreversible binding sites*.
 - i/ Equilibrate with 20 mL NaPO₄ Buffer (0.1 M, pH 7).
 - ii/ Wash with 20 mL of biotin (25 mg in 20 mL NaPO₄ buffer, sonicate to dissolve) :
 - centrifuge at 1500 RPM for 10 min at 4°, pipet the supernatant and add the biotin.
 - iii/ Wait 30 min (on ice).
 - iv/ *Regeneration* : Wash with 20 mL of 10 % acetic acid. Wash with 20 mL of 0.1 M NaPO₄ buffer, pH 7 (stop when PH reach 6.8).
- Use one **Pharmacia HiTrapQ** ion-exchange column. Equilibrate it with 30 mL HQ 50 in cold room. Use a peristaltic pump.

PURIFICATION, day 4

- Add β mercapto ethanol in the buffers.
- From 30 mL of frozen cells (2L culture), **thaw** partially in RT water bath.
- Add 600 μ L of **lysozyme** (purple marker on the top of the eppendorf). Wait 15 to 30 minutes, the liquid becomes viscous.
- Use 10 **bio-rad 10DG desalting columns**. Equilibrate with 30 mL Wash Buffer during the sonication and the centrifugation in cold room (fig. 1).
 - **Sonicate** cells (2X 15mL) on ice. Repeat 5 or 6 times : 20 s sonication with high power, 1 min without power. The liquid becomes more fluid.
 - **Spinning** in 25 mL plastic tubes with metal screw cap, 40K, rotor : Ti70 (2sd floor), 4°, 30 min.
 - Replace NaPO₄ Buffer of the avidin column by Wash Buffer.
 - In cold room, dry the **desalting columns**. Put 3.3 mL of lysate on the top of them. When lysate is entirely absorbed into column, add 3.3 mL of Wash Buffer to each column and collect proteins in ten 10 mL tubes placed on the bottom of the columns.
 - Pipet the supernatant of the avidin column and add the collected lysate. Put the column on the **rotary wheel for 1 or 2h** in cold room. (This step is inefficient, find a better way).
 - **Wash** the avidin columns 5 times (centrifuge 10 min, 4°, 1500 rpm, pipet the supernatant and add 20 mL Wash Buffer the first time and then HQ 50). Resuspend the column each time.
 - After the last wash, resuspend the column in 10 mL HQ 50. In cold room, put the resin in a yellow column. Wait 5 minutes, the HQ 50 buffer falls. Connect the avidin column to the HiTrapQ column. Put 20 ml of biotin (25 mg d-biotin in 20 mL HQ

50, sonicate to dissolve) on the top of the resin and switch on the pump. Be careful of water drains. The **elution** lasts about 30 minutes (fig. 2).

- Switch off the pump. Unplug avidin column and **plug in gradient mixer** above HiTrapQ column. (7.5 mL of HQ 500 in the first channel, 7.5 mL of the HQ 50 in the second channel. Use a magnetic stirring rod in the second channel.) Switch on the pump and then open the connections between the channels. Be careful of bubbles between them (fig. 3).

- Collect 1 mL fractions, every 2 min. **Monitor** fractions with **bradford assay** : on micro-well plate, 200 μL (dye diluted by 5 with water), 20 μL sample. For a good prep, peak protein concentration is around 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and bradford should be blue. Bio-Kin elute at ~ 300 mM NaCl, generally in fractions 9 or 10. Collect 2 best fractions.

- **Dialyse** (SpectraPor 10 kD microporous membrane, 0.5 to 3mL) 2h in 1l of storage buffer, in cold room. Change the buffer, then 2h in 1L of storage buffer again. Use gloves, a float, a 2 mL syringe and 2 needles. First, wet the membrane in the storage buffer. Then, with two needles, inject proteins in the membrane carefully. Take off one needle and aspire the excess of air.

- Backward steps (put air with one needle, aspire proteins with two needles). The final volume is about 0.8 mL. Make around 80 aliquots of 10 μL with PCR tubes. **Freeze** them in liquid nitrogen and store.

Composition of the buffers

Lysis Buffer : for 100 mL

| Solution | Initial concentration | Final concentration | Volume |
|-------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| Imidazol pH=6.7 | 1 M | 30 mM | 3 mL |
| EGTA | 0.5 M | 2 mM | 0.4 mL |
| MgCl ₂ | 1 M | 4 mM | 0.4 mL |
| DTT | 1 M | 2 mM | 0.2 mL |
| Water | | | 96 mL |

Wash Buffer : for 500 mL

| Solution | Initial concentration | Final concentration | Volume |
|-------------------|-----------------------|---------------------|---------|
| Imidazol pH=6.7 | 1 M | 50 mM | 25 mL |
| NaCl | 5 M | 50 mM | 5 mL |
| EGTA | 0.5 M | 2 mM | 2 mL |
| MgCl ₂ | 1 M | 4 mM | 2 mL |
| β -mercapto | | 10 mM | 0,39 mL |
| Water | | | 466 mL |

HQ 50 : for 500 mL

Annexe C. Purification de la kinésine

| Solution | Initial concentration | Final concentration | Volume |
|-------------------|-----------------------|---------------------|---------|
| Imidazol pH=6.7 | 1 M | 50 mM | 25 mL |
| NaCl | 5 M | 50 mM | 5 mL |
| MgCl ₂ | 1 M | 4 mM | 2 mL |
| β -marcapto | | 10 mM | 0,39 mL |
| Water | | | 468 mL |

HQ 500 : for 100 mL

| Solution | Initial concentration | Final concentration | Volume |
|-------------------|-----------------------|---------------------|----------|
| Imidazol pH=6.7 | 1 M | 50 mM | 5 mL |
| NaCl | 5 M | 500 mM | 10 mL |
| MgCl ₂ | 1 M | 4 mM | 0.4 mL |
| β -marcapto | | 10 mM | 0,078 mL |
| Water | | | 84.5 mL |

Storage buffer : for 2 L

| Solution | Initial concentration | Final concentration | Volume |
|-------------------|-----------------------|---------------------|-----------|
| Imidazol pH=6.7 | 1 M | 30 mM | 100 mL |
| KCl | 1 M | 50 mM | 100 mL |
| MgCl ₂ | 1 M | 4 mM | 8 mL |
| EGTA | 0.5 M | 2 mM | 8 mL |
| Glycerol | | | 400 mL |
| β -marcapto | | 10 mM | 1.56 mL |
| ATP | 0.1 M | 50 nM | 1 μ L |
| Water | | | 1384 mL |

Notations et abréviations

MT : microtubule
TGN : Trans Golgi Network
VSVG : Vesicular stomatitis virus G
RE : Reticulum Endoplasmique
BFA : Brefeldin A
MAP : Microtubule Associated Protein
ATP : adénosine tri phosphate
ADP : adénosine-di-phosphate
GTP : guanosine-tri-phosphate
GDP : guanosine-di-phosphate
DIC : contraste interférentiel différentiel
GUV : Giant Unilamellar vesicle; vésicule géante et unilamellaire
LUV : Large Unilamellar vesicle; vésicule large et unilamellaire
SUV : Small Unilamellar vesicle; vésicule petite et unilamellaire
EPC : Egg-phosphatidylcholine
PC : phosphatidylcholine
PS : phosphatidylsérine
PE : phosphatidyléthanolamine
SM : sphingomyéline
DSPE-Biot-Rhod : rhodamin-biotin Di-steryl-phosphatidylethanolamine
DMPC : Di-myristoyl-phosphatidylcholine
DOPC : Di-oleyl-phosphatidylcholine
BODIPY PC : β -BODIPY 530/550 C_5 -hexadecanoyl phosphatidylcholine
PEG : Polyéthylène Glycol
FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching
FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy
ADE : Area Difference Elasticity
BC : Bilayer coupling
SC : Spontaneous curvature
 k_u^0 : taux de détachement d'une kinésine marchant le long d'un microtubule
 k_b : taux d'attachement d'une kinésine sur un microtubule
 V_0 : vitesse de la kinésine en l'absence de force appliquée
 F_S : force d'arrêt de la kinésine
 F_0 : force nécessaire pour extraire un tube de membrane
 σ : tension de membrane d'une vésicule

κ : rigidité de courbure d'une vésicule

L_t : longueur du tube de membrane

R_t : rayon du tube de membrane

R_p : rayon de la micropipette

L_p : longueur de la langue dans la micropipette

f : force appliquée mécaniquement pour extraire un tube de membrane d'une vésicule micromanipulée

Bibliographie

- [Abkarian et al., 2002] Abkarian, M., Lartigue, C., and Viallat, A. (2002). Tank treading and unbinding of deformable vesicles in shear flow : determination of the lift force. *Phys. Rev. Lett.*, 88 :068103.
- [Addinall et al., 2001] Addinall, S., Mayr, P., Doyle, S., Sheehan, J., Woodman, P., and Allan, V. (2001). Phosphorylation by cdc2-cyclinb1 kinase releases cytoplasmic dynein from membranes. *J Biol Chem*, 276 :15939.
- [Alberts et al., 1995] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. (1995). *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine-Sciences, Flammarion.
- [Alberts et al., 2002] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. (2002). *Molr Biol. Cell*. Garland science, 4th edition.
- [Allain et al., 2004] Allain, J., Storm, C., Roux, A., Amar, M. B., and Joanny, J. (2004). Fission of a multiphase membrane tube. *Phys. Rev. Lett.*, 93 :158104.
- [Allan, 1995] Allan, V. (1995). Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. *J. Cell Biol.*, 128 :879.
- [Allan and Schroer, 1999] Allan, V. and Schroer, T. (1999). Membrane motors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11 :476.
- [Allan et al., 2002] Allan, V., Thompson, H., and McNiven, M. (2002). Motoring around the golgi. *Nat. Cell Biol.*, 4 :E236.
- [Allan and Vale, 1991] Allan, V. and Vale, R. (1991). Cell cycle control of microtubule-based membrane transport and tubule formation in vitro. *J. Cell Biol.*, 113 :347.
- [Allan and Vale, 1994] Allan, V. and Vale, R. (1994). Movement of membrane tubules along microtubules in vitro : evidence for specialised sites of motor attachment. *J Cell Sci*, 107 :1885.
- [Allen et al., 1981] Allen, R., Allen, N., and Travis, J. (1981). Video-enhanced contrast, differential interference contrast (avec-dic) microscopy : a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *allogromia laticollaris*. *Cell Motil.*, 1 :291.
- [Amos and Baker, 1979] Amos, L. and Baker, T. (1979). The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*, 279 :607.

- [Angelova et al., 1992] Angelova, M., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, J., and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 89 :127.
- [Asaba et al., 2003] Asaba, N., Hanada, T., Takeuchi, A., and Chishti, A. (2003). Direct interaction with a kinesin-related motor mediates transport of mammalian discs large tumor suppressor homologue in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 278 :8395.
- [Asbury, 2005] Asbury, C. (2005). Kinesin : world's tiniest biped. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17 :89.
- [Axelrod et al., 1976] Axelrod, D., Koppel, D., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.*, 16 :1055.
- [Bacri et al., 1996] Bacri, J.-C., Cabuil, V., Cebers, A., Menager, C., and Perzynski, R. (1996). Flattening of ferro-vesicle undulations under a magnetic field. *Europhys. Lett.*, 33 :235.
- [Badoual et al., 2002] Badoual, M., Julicher, F., and Prost, J. (2002). Bidirectional cooperative motion of molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 :6696.
- [Baeriswyl, 1987] Baeriswyl, editor (1987). *Physics in living matter*. Academic Press, 2nd edition.
- [Bar-Ziv and Moses, 1994] Bar-Ziv, R. and Moses, E. (1994). Instability and pearling states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension. *Phys. Rev. Lett.*, 73 :1392.
- [Barlowe et al., 1994] Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). Copei : a membrane coat formed by sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77 :895.
- [Barrett et al., 1999] Barrett, M., Walmsley, A., and Gould, G. (1999). Structure and function of facilitative sugar transporters. *Curr Opin Cell Biol*, 11 :496.
- [Baumgart et al., 2003] Baumgart, T., Hess, S., and Webb, W. (2003). Imaging co-existing fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425 :821.
- [Berliner et al., 1994] Berliner, E., Mahtani, H., Karki, S., Chu, L., J.E. Cronan, J., and Gelles, J. (1994). Microtubule movement by a biotininated kinesin bound to streptavidin-coated surface. *J. Biol. Chem.*, 269 :8610.
- [Block et al., 2003] Block, S., Asbury, C., Shaevitz, J., and Lang, M. (2003). Probing the kinesin reaction cycle with a 2d optical force clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100 :2351.
- [Block et al., 1990] Block, S., Goldstein, L., and Schnapp, B. (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*, 348 :348.
- [Bloom et al., 1991] Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O. (1991). Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes : a perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 24 :293.

Bibliographie

- [Bo and Waugh, 1989] Bo, L. and Waugh, R. (1989). Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles. *Biophys. J.*, 55 :509.
- [Bonifacino and Glick, 2004] Bonifacino, J. and Glick, B. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116 :153.
- [Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003] Bonifacino, J. and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins : shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4 :409.
- [Boulbitch et al., 2001] Boulbitch, A., Guttenberg, Z., and Sackmann, E. (2001). Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys. J.*, 81 :2743.
- [Bozic et al., 1992] Bozic, B., Svetina, S., Zeks, B., and Waugh, R. (1992). Role of lamellar membrane structure in tether formation from bilayer vesicles. *Biophys. J.*, 61 :963.
- [Brady, 1985] Brady, S. (1985). A novel brain atpase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 317 :73.
- [Bretscher, 1973] Bretscher, M. (1973). Membrane structure : some general principles. *Science*, 181 :622.
- [Brochard and Lennon, 1975] Brochard, F. and Lennon, J.-F. (1975). Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J. Phys.*, 36 :1035.
- [Brochard-Wyart and de Gennes, 2002] Brochard-Wyart, F. and de Gennes, P. (2002). Adhesion induced by mobile binders : Dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 :7854.
- [Brown, 1999] Brown, S. (1999). Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15 :63.
- [Bukman et al., 1996] Bukman, D. J., Yao, J. H., and Wortis, M. (1996). Stability of cylindrical vesicles under axial tension. *Phys. Rev. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 54 :5463.
- [Bulinski et al., 1997] Bulinski, J., McGraw, T., Gruber, D., Nguyen, H., and Sheetz, M. (1997). Overexpression of map4 inhibits organelle motility and trafficking in vivo. *J Cell Sci*, 110 (Pt 24) :3055.
- [Burger, 2000] Burger, K. (2000). Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic*, 1 :605.
- [Burkhardt, 1996] Burkhardt, J. (1996). In search of membrane receptors for microtubule-based motors - is kinectin a kinesin receptor? *Trends Cell Biol.*, 6 :127.
- [Burkhardt et al., 1997] Burkhardt, J., Echeverri, C., Nilsson, T., and Vallee, R. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.*, 139 :469.

- [Busch and Brunner, 2004] Busch, K. and Brunner, D. (2004). The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol*, 14 :548.
- [Campàs et al., 2005a] Campàs, O., Leduc, C., Bassereau, P., Joanny, J.-F., and Prost, J. (2005a). Organization of molecular motors at the tip of a growing tube. *In preparation*.
- [Campàs et al., 2005b] Campàs, O., Leduc, C., Bassereau, P., Joanny, J.-F., and Prost, J. (2005b). Oscillations in tube extraction. *In preparation*.
- [Campàs et al., 2005c] Campàs, O., Leduc, C., Bassereau, P., Prost, J., and Joanny, J.-F. (2005c). Scale of motors set by langmuir kinetics. *In preparation*.
- [Canham, 1970] Canham, P. (1970). The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of human red blood cell. *J. Theor. Biol.*, 26 :61.
- [Cao et al., 2000] Cao, H., Thompson, H., Krueger, E., and McNiven, M. (2000). Disruption of golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin. *J. Cell Sci.*, 113 :1993.
- [Cappello et al., 2003] Cappello, G., Badoual, M., Ott, A., Prost, J., and Busoni, L. (2003). Kinesin motion in the absence of external forces characterized by interference total internal reflection microscopy. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, 68 :1.
- [Ceccarelli et al., 1972] Ceccarelli, B., Hurlbut, W., and Mauro, A. (1972). Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J. Cell Biol.*, 54 :30.
- [Chalfie et al., 1994] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., and Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 :802.
- [Chapman, 1975] Chapman, D. (1975). Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q. Rev. Biophys.*, 8 :185.
- [Chretien and Wade, 1991] Chretien, D. and Wade, R. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell*, 71 :161.
- [Cluett et al., 1993] Cluett, E., Wood, S., Banta, M., and Brown, W. (1993). Tubulation of golgi membranes in vivo and in vitro in the absence of brefeldin a. *J. Cell Biol.*, 120 :15.
- [Cole and Lippincott-Schwartz, 1995] Cole, N. and Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr Opin Cell Biol*, 7 :55.
- [Cole et al., 1996] Cole, N., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption : regeneration of golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell*, 7 :631.
- [Conner and Schmid, 2003] Conner, S. and Schmid, S. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422 :37.

Bibliographie

- [Cooper et al., 1990] Cooper, M., Cornell-Bell, A., Chernjavsky, A., Dani, J., and Smith, S. (1990). Tubulovesicular processes emerge from trans-golgi cisternae, extend along microtubules, and interlink adjacent trans-golgi elements into a reticulum. *Cell*, 61 :135.
- [Coppin et al., 1996] Coppin, C., Finer, J., Spudich, J., and Vale, R. (1996). Detection of sub-8-nm movements of kinesin by high-resolution optical-trap microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 :1913.
- [Corda et al., 2002] Corda, D., Carcedo, C. H., Bonazzi, M., Luini, A., and Spano, S. (2002). Molecular aspects of membrane fission in the secretory pathway. *Cell Mol. Life Sci.*, 59 :1819.
- [Coy et al., 1999a] Coy, D., Hancock, W., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999a). Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell Biol.*, 1 :288.
- [Coy et al., 1999b] Coy, D., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999b). Kinesin takes one 8-nm step for each atp that it hydrolyzes. *J. Biol. Chem.*, 274 :3667.
- [Crevel et al., 1999] Crevel, I., Carter, N., Schliwa, M., and Cross, R. (1999). Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive neurospora kinesin. *EMBO J.*, 18 :5863.
- [Cross, 2004] Cross, R. (2004). The kinetic mechanism of kinesin. *Trends Biochem. Sci.*, 29 :301.
- [Cross et al., 2000] Cross, R., Crevel, I., Carter, N., Alonso, M., Hirose, K., and Amos, L. (2000). The conformational cycle of kinesin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 355 :459.
- [Cuvelier et al., 2005a] Cuvelier, D., Baseereau, P., and Nassoy, P. (2005a). Pulling long tubes from firmly adhered vesicles. *submitted to EPL*.
- [Cuvelier et al., 2005b] Cuvelier, D., Derényi, I., Bassereau, P., and Nassoy, P. (2005b). Coalescence of membrane tethers : Experiments, theory and applications. *Biophys. J.*, 88 :2714.
- [Cuvelier and Nassoy, 2004] Cuvelier, D. and Nassoy, P. (2004). Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. *Phys. Rev. Lett.*, 93 :228101.
- [Dabora and Sheetz, 1988] Dabora, S. and Sheetz, M. (1988). The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the er from cultured cell extracts. *Cell*, 54 :27.
- [Davidson et al., 2005] Davidson, M., Dommersnes, P., Markstrom, M., Joanny, J., Karlsson, M., and Orwar, O. (2005). Fluid mixing in growing microscale vesicles conjugated by surfactant nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 :1251.
- [Döbereiner, 2000] Döbereiner, H.-G. (2000). Fluctuating vesicle shapes. In Luisi, P. and Walde, P., editors, *Giant vesicles*, volume John Wiley & Sons, Inc., page 149.
- [Döbereiner et al., 1997] Döbereiner, H.-G., Evans, E., Kraus, M., Seifert, U., and Wortis, M. (1997). Mapping vesicles shapes into the phase diagram : a comparison of experiment and theory. *Phys. Rev. E*, 55 :4458.

- [DePina and Langford, 1999] DePina, A. and Langford, G. (1999). Vesicle transport : the role of actin filaments and myosin motors. *Micros. Res. Tech.*, 47 :93.
- [Derényi et al., 2002] Derényi, I., Jülicher, F., and Prost, J. (2002). Formation and interaction of membrane tubes. *Phys. Rev. Lett.*, 88 :238101.
- [Derényi and Vicsek, 1996] Derényi, I. and Vicsek, T. (1996). The kinesin walk : a dynamic model with elastically coupled heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93 :6775.
- [Desai and Mitchison, 1997] Desai, A. and Mitchison, T. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13 :83.
- [Devaux, 1991] Devaux, P. (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 30 :1163.
- [Devaux and Morris, 2004] Devaux, P. and Morris, R. (2004). Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic*, 5 :241.
- [Dobereiner et al., 1995] Dobereiner, H., Evans, E., Seifert, U., and Wortis, M. (1995). Spinodal fluctuations of budding vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, 75 :3360.
- [Dobereiner et al., 1993] Dobereiner, H., Kas, J., Noppl, D., Sprenger, I., and Sackmann, E. (1993). Budding and fission of vesicles. *Biophys. J.*, 65 :1396.
- [Dogterom et al., 2005] Dogterom, M., Kerssemakers, J., Romet-Lemonne, G., and Janson, M. (2005). Force generation by dynamic microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17 :67.
- [Dornier, 2005] Dornier, A. (2005). *Etude du mouvement de la kinésine par suivi de particule unique par onde évanescente progressive*. PhD thesis, Université Paris 6, Institut Curie.
- [Drecktrah et al., 2003] Drecktrah, D., Chambers, K., Racoosin, E., Cluett, E., Gucwa, A., Jackson, B., and Brown, W. (2003). Inhibition of a golgi complex lysophospholipid acyltransferase induces membrane tubule formation and retrograde trafficking. *Mol. Biol. Cell*, 14 :3459.
- [Dreier and Rapoport, 2000] Dreier, L. and Rapoport, T. (2000). In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J. Cell Biol.*, 148 :883.
- [Duve, 1975] Duve, C. (1975). Exploring cells with a centrifuge. *Science*, 189 :186.
- [Duwe et al., 1990] Duwe, H.-P., Käs, J., and Sackmann, E. (1990). Bending elasticity moduli of lipid bilayers : modulation by solutes. *J. Phys. France*, 51 :945.
- [Ebnet et al., 1998] Ebnet, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum : implications for alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 143 :777.
- [Echard et al., 1998] Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.-J., Rousset, A., Janoueix-Lerosey, I., and Goud, B. (1998). Interaction of a golgi-associated kinesin-like protein with rab6. *Science*, 279 :580.

Bibliographie

- [Edidin, 2003] Edidin, M. (2003). Lipids on the frontier : a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4 :414.
- [Eggl and Sackmann, 1989] Eggl, H.-P. D. P. and Sackmann, E. (1989). The cell-plasma membrane as composite system of two-dimensional liquid crystal and macromolecular network and how to mimick its physical properties. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 166 :1.
- [Eichenlaub-Ritter and Tucker, 1984] Eichenlaub-Ritter, U. and Tucker, J. (1984). Microtubules with more than 13 protofilaments in the dividing nuclei of ciliates. *Nature*, 307 :60.
- [Endow, 2003] Endow, S. (2003). Kinesin motors as molecular machines. *Bioessays*, 25 :1212.
- [Endow and Higuchi, 2000] Endow, S. and Higuchi, H. (2000). A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature*, 406 :913.
- [Evans, 1973] Evans, E. (1973). A new material concept for the red cell membrane. *Biophys J*, 13 :926.
- [Evans, 2001] Evans, E. (2001). Probing the relation between force–lifetime–and chemistry in single molecular bonds. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30 :105.
- [Evans et al., 1996] Evans, E., Bowman, H., Leung, A., Needham, D., and Tirrell, D. (1996). Biomembrane templates for nanoscale conduits and networks. *Science*, 173 :933.
- [Evans and Hochmuth, 1976] Evans, E. and Hochmuth, R. (1976). Membrane viscoplastic flow. *Biophys. J*, 16 :13.
- [Evans and Rawicz, 1990] Evans, E. and Rawicz, W. (1990). Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 64 :2094.
- [Evans and Rawicz, 1997] Evans, E. and Rawicz, W. (1997). Elasticity of fuzzy membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 79 :2379.
- [Evans and Ritchie, 1997] Evans, E. and Ritchie, K. (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.*, 72 :1541.
- [Evans et al., 1995] Evans, E., Ritchie, K., and Merkel, R. (1995). Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophys. J.*, 68 :2580.
- [Evans and Yeung, 1994] Evans, E. and Yeung, A. (1994). Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape. *Chem. Phys. Lipids*, 73 :39.
- [Farge and Devaux, 1992] Farge, E. and Devaux, P. (1992). Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids. *Biophys. J*, 61 :347.
- [Farsad and Camilli, 2003] Farsad, K. and Camilli, P. D. (2003). Mechanisms of membrane deformation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15 :372.
- [Farsad et al., 2001] Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S., Rose, K., and Camilli, P. D. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.*, 155 :193.

- [Faucon et al., 1989] Faucon, J., Mitov, M., Méléard, P., Bivas, I., and Bothorel, P. (1989). Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. theoretical and experimental requirements. *J. Phys. France*, 50 :2389.
- [Feynman et al., 1963] Feynman, R., Leighton, R., and Sands, M. (1963). *The Feynman lectures on Physics Vol.1*. Addison-Wesley, Reading, MA.
- [Fournier et al., 2001] Fournier, J., Ajdari, A., and Peliti, L. (2001). Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 86 :4970.
- [Fullerton et al., 1998] Fullerton, A., Bau, M., Conrad, P., and Bloom, G. (1998). In vitro reconstitution of microtubule plus end-directed, gtpgamma-sensitive motility of golgi membranes. *Mol. Biol. Cell*, 9 :2699.
- [Gelles et al., 1988] Gelles, J., Schnapp, B., and Sheetz, M. (1988). Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331 :450.
- [Gibbons, 1981] Gibbons, I. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell. Biol.*, 91 :107s.
- [Gill et al., 1991] Gill, S., Schroer, T., Szilak, I., Steuer, E., Sheetz, M., and Cleveland, D. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.*, 115 :1639.
- [Girard et al., 2004] Girard, P., Julicher, F., and Prost, J. (2004). Fluid membranes exchanging material with external reservoirs. *Eur. Phys. J. E Soft Matter*, 14 :387.
- [Girard et al., 2005] Girard, P., Prost, J., and Bassereau, P. (2005). Passive or active fluctuations in membranes containing proteins. *Phys. Rev. Lett.*, 94 :088102.
- [Girod et al., 1999] Girod, A., Storrie, B., Simpson, J., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L., Lord, J., Nillson, T., and Pepperkok, R. (1999). Evidence for a cop-independent transport route from the golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.*, 1 :423.
- [Gittes et al., 1996] Gittes, F., Meyhofer, E., Baek, S., and Howard, J. (1996). Directional loading of the kinesin motor molecule as it buckles a microtubule. *Biophys. J.*, 70 :418.
- [Goldstein et al., 1979] Goldstein, J., Anderson, R., and Brown, M. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 279 :679.
- [Goldstein and Philp, 1999] Goldstein, L. and Philp, A. (1999). The road less traveled : emerging principles of kinesin motor utilization. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15 :141.
- [Golgi, 1898] Golgi, C. (1898). Sur la structure des cellules nerveuses. *Arch. Ital. Biol.*, 30 :60.
- [Gordon et al., 1995] Gordon, G., Chazotte, B., Wang, X., and Herman, B. (1995). Analysis of simulated and experimental fluorescence recovery after photobleaching. data for two diffusing components. *Biophys. J.*, 68 :766.
- [Grill et al., 2003] Grill, S., Howard, J., Schaffer, E., Stelzer, E., and Hyman, A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science*, 301 :518.

- [Gupte et al., 1984] Gupte, S., Wu, E., Hoehli, L., Hoehli, M., Jacobson, K., Sowers, A., and Hackenbrock, C. (1984). Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 81 :2606.
- [Hackney, 1994] Hackney, D. (1994). The rate-limiting step in microtubule-stimulated atp hydrolysis by dimeric kinesin head domains occurs while bound to the microtubule. *J. Biol. Chem.*, 269 :16508.
- [Hackney, 1995] Hackney, D. (1995). Highly processive microtubule-stimulated atp hydrolysis by dimeric kinesin head domains. *Nature*, 377 :448.
- [Hackney et al., 1992] Hackney, D., Levitt, J., and Suhan, J. (1992). Kinesin undergoes a 9 s to 6 s conformational transition. *J. Biol. Chem.*, 267 :8696.
- [Hagerman, 1988] Hagerman, P. (1988). Flexibility of dna. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17 :265.
- [Haimo, 1995] Haimo, L. (1995). Regulation of kinesin-directed movements. *Trends Cell Biol.*, 5 :165.
- [Hancock and Howard, 1998] Hancock, W. and Howard, J. (1998). Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J. Cell Biol.*, 140 :1395.
- [Hancock and Howard, 1999] Hancock, W. and Howard, J. (1999). Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the atp hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :13147.
- [Harada et al., 1998] Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.*, 141 :51.
- [Häckl et al., 1997] Häckl, W., Seifert, U., and Sackmann, E. (1997). Effects of fully and partially solubilized amphiphiles on bilayer bending stiffness and temperature dependence of the effective tension of giant vesicles. *J. Phys. II France*, 7 :1141.
- [Heinrich et al., 1999] Heinrich, V., Bozic, B., Svetina, S., and Zeks, B. (1999). Vesicle deformation by an axial load : from elongated shapes to tethered vesicles. *Biophys. J.*, 76 :2056.
- [Heinrich et al., 1993] Heinrich, V., Svetina, S., and Zeks, B. (1993). Nonaxisymmetric vesicle shapes in a generalized bilayer-couple model and the transition between oblate and prolate axisymmetric shapes. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 48 :3112.
- [Heinrich and Waugh, 1996] Heinrich, V. and Waugh, R. (1996). A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes. *Ann. Biomed. Eng.*, 24 :595.
- [Helfrich, 1973] Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C.*, 28 :693.
- [Helfrich, 1985] Helfrich, W. (1985). Effect of thermal undulations on the rigidity of fluid membranes and interfaces. *J. Phys.*, 46 :1263.
- [Helfrich and Servuss, 1984] Helfrich, W. and Servuss, R.-M. (1984). Undulations, steric interactions and cohesion of fluid membranes. *Nuovo Cimento*, 3 D :137.

- [Helms and Zurzolo, 2004] Helms, J. and Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals : Lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, 5 :247.
- [Heuser, 1989] Heuser, J. (1989). Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol*, 108 :855.
- [Hirokawa, 1998] Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279 :519.
- [Hirokawa et al., 1989] Hirokawa, N., Pfister, K., Yorifuji, H., Wagner, M., Brady, S., and Bloom, G. (1989). Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell*, 56 :867.
- [Hirschberg et al., 1998] Hirschberg, K., Miller, C., Ellenberg, J., Presley, J., Siggia, E., Phair, R., and Lippincott-Schwartz, J. (1998). Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.*, 143 :1485.
- [Hochmuth and Evans, 1982] Hochmuth, R. and Evans, E. (1982). Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. i. analysis. *Biophys. J.*, 39 :71.
- [Hochmuth et al., 1973] Hochmuth, R., Mohandas, N., and P.L. Blackshear, J. (1973). Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J*, 13 :747.
- [Hochmuth et al., 1982] Hochmuth, R., Wiles, H., Evans, E., and McCown, J. (1982). Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. ii. experiment. *Biophys. J.*, 39.
- [Hoenger and Milligan, 1997] Hoenger, A. and Milligan, R. (1997). Motor domains of kinesin and ncd interact with microtubule protofilaments with the same binding geometry. *J. Mol. Biol.*, 265 :553.
- [Hoenger et al., 2000] Hoenger, A., Thormahlen, M., Diaz-Avalos, R., Doerhoefer, M., Goldie, K. N., Muller, J., and Mandelkow, E. (2000). A new look at the microtubule binding patterns of dimeric kinesins. *J. Mol. Biol.*, 297 :1087.
- [Hollenbeck, 1993] Hollenbeck, P. (1993). Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J. Cell Biol.*, 121 :305.
- [Holleran et al., 1998] Holleran, E., Karki, S., and Holzbaur, E. (1998). The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int. Rev. Cytol.*, 182 :69.
- [Hopkins et al., 1990] Hopkins, C., Gibson, A., Shipman, M., and Miller, K. (1990). Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature*, 346 :335.
- [Hopkins et al., 2000] Hopkins, S., Vale, R., and Kuntz, I. (2000). Inhibitors of kinesin activity from structure-based computer screening. *Biochemistry*, 39 :2805.
- [Howard, 1997] Howard, J. (1997). Molecular motors : structural adaptations to cellular functions. *Nature*, 389 :561.
- [Howard, 2001] Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. MA Sinauer Associates Inc - Sunderland.

- [Howard et al., 1989] Howard, J., Hudspeth, A., and Vale, R. (1989). Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature*, 342 :154.
- [Howard and Hyman, 2003] Howard, J. and Hyman, A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end - review. *Nature*, 422 :753.
- [Hua et al., 2002] Hua, W., Chung, J., and Gelles, J. (2002). Distinguishing inch-worm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 295 :844.
- [Hua et al., 1997] Hua, W., Young, E., Fleming, M., and Gelles, J. (1997). Coupling of kinesin steps to atp hydrolysis. *Nature*, 388 :390.
- [Huang et al., 1999] Huang, J., Brady, S., Richards, B., Stenolen, D., Resau, J., Copeland, N., and Jenkins, N. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature*, 397 :267.
- [Hunt et al., 1994] Hunt, A., Gittes, F., and Howard, J. (1994). The force exerted by a single kinesin molecule against a viscous load. *Biophys. J.*, 67 :766.
- [Inoue, 1981] Inoue, S. (1981). Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 91 :131s.
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London, 2nd edition.
- [J.A. Hammer and Wu, 2002] J.A. Hammer, r. and Wu, X. (2002). Rabs grab motors : defining the connections between rab gtpases and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14 :69.
- [Jamora et al., 1999] Jamora, C., Yamanouye, N., Lint, J. V., Laudenslager, J., Vandenheede, J., Faulkner, D., and Malhotra, V. (1999). Gbetagamma-mediated regulation of golgi organization is through the direct activation of protein kinase d. *Cell*, 98 :59.
- [Jaric et al., 1995] Jaric, M., Seifert, U., Wintz, W., and Wortis, M. (1995). Vesicular instabilities : The prolate-to-oblate transition and other shape instabilities of fluid bilayer membranes. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 52 :6623.
- [Jie et al., 1998] Jie, Y., Quanhui, L., Jixing, L., and Zhing-Can, O.-Y. (1998). Numerical observation of nonaxisymmetric vesicles in fluid membranes. *Phys. Rev. E*, 58 :4730.
- [Jülicher, 1996] Jülicher, F. (1996). The morphology of vesicles of higher topological genus : conformal degeneracy and conformal modes. *J. Phys. II France*, 6 :1797.
- [Jülicher et al., 1997] Jülicher, F., Ajdari, A., and Prost, J. (1997). Modeling molecular motors. *Rev. Mod. Phys.*, 69 :1269.
- [Jülicher and Duke, 2000] Jülicher, F. and Duke, T. (2000). Les protéines motrices : la main d'oeuvre de la cellule. *Image de la physique*, page 44.
- [Jolimaitre et al., 2005] Jolimaitre, P., Roux, A., Blanpain, A., Leduc, C., Bassereau, P., and Bourel-Bonnet, L. (2005). Synthesis and preliminary physical applications of a rhodamin-biotin phosphatidylethanolamine, an easy attainable lipid double probe. *Chem. Phys. Lipids*, 133 :215.

- [Julicher and Prost, 1995] Julicher, F. and Prost, J. (1995). Cooperative molecular motors. *Phys. Rev. Lett.*, 75 :2618.
- [Julicher and Seifert, 1994] Julicher, F. and Seifert, U. (1994). Shape equations for axisymmetric vesicles : A clarification. *Phys. Rev. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 49 :4728.
- [Kahya et al., 2003] Kahya, N., Scherfeld, D., Bacia, K., Poolman, B., and Schwille, P. (2003). Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 278 :28109.
- [Kaler et al., 1989] Kaler, E., Murthy, A., Rodriguez, B., and Zasadzinski, J. (1989). Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants. *Science*, 245 :1371.
- [Kamal et al., 2000] Kamal, A., Stokin, G., Yang, Z., Xia, C., and Goldstein, L. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-i. *Neuron*, 28 :449.
- [Karcher et al., 2001] Karcher, R., Roland, J., Zappacosta, F., Huddleston, M., Annan, R., Carr, S., and Gelfand, V. (2001). Cell cycle regulation of myosin-v by calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii. *Science*, 293 :1317.
- [Kawaguchi and Ishiwata, 2001] Kawaguchi, K. and Ishiwata, S. (2001). Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin. *Science*, 291 :667.
- [Kirchhausen, 2002] Kirchhausen, T. (2002). Clathrin adaptors really adapt. *Cell*, 109 :413.
- [Kirschner and Mitchison, 1986] Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly : from microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45 :329.
- [Klausner et al., 1992] Klausner, R., Donaldson, J., and Lippincott-Schwartz, J. (1992). Brefeldin a : insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.*, 116 :1071.
- [Kleijmeer et al., 2001] Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A., Ossendorp, F., Melief, C., Stoorvogel, W., and Geuze, H. (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates mhc class ii antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.*, 155 :53.
- [Klopfenstein et al., 1998] Klopfenstein, D., Kappeler, F., and Hauri, H. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *Embo J.*, 17 :6168.
- [Klopfenstein et al., 2002] Klopfenstein, D., Tomishige, M., Stuurman, N., and Vale, R. (2002). Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the unc104 kinesin motor. *Cell*, 109 :347.
- [Klopfenstein et al., 2000] Klopfenstein, D., Vale, R., and Rogers, S. (2000). Motor protein receptors : moonlighting on other jobs. *Cell*, 103 :537.
- [Klumperman et al., 1998] Klumperman, J., Schweizer, A., Clausen, H., Tang, B., Hong, W., Oorschot, V., and Hauri, H. (1998). The recycling pathway of protein ergic-53 and dynamics of the er-golgi intermediate compartment. *J. Cell Sci.*, 111 :3411.

Bibliographie

- [Kojima et al., 1997] Kojima, H., Muto, E., Higuchi, H., and Yanagida, T. (1997). Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.*, 73 :2012.
- [Kolomeisky et al., 1998] Kolomeisky, A., Schutz, G., Kolomeisky, E., and J.Straley (1998). Phase diagram of one-dimensional driven lattice gases with open boundaries. *J. Phys. A Math. Gen.*, 31 :6911.
- [Koshiba et al., 2004] Koshiba, T., Detmer, S., Kaiser, J., Chen, H., McCaffery, J., and Chan, D. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305 :858.
- [Koster et al., 2005] Koster, G., Cacciuto, A., Derényi, I., Frenkel, D., and Dogterom, M. (2005). Force barriers for membrane tube formation. *Phys. Rev. Lett.*, 94 :0681011.
- [Koster et al., 2003] Koster, G., VanDuijn, M., Hofs, B., and Dogterom, M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 :15583.
- [Kramers, 1940] Kramers, H. (1940). Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica (Utrecht)*, 7 :284.
- [Kraus et al., 1996] Kraus, M., Wintz, W., Seifert, U., and Lipowsky, R. (1996). Fluid vesicles in shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 77 :3685.
- [Krebs et al., 2004] Krebs, A., Goldie, K., and Hoenger, A. (2004). Complex formation with kinesin motor domains affects the structure of microtubules. *J. Mol. Biol.*, 335 :139.
- [Kreitzer et al., 2000] Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., and Rodriguez-Boulan, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat. Cell Biol.*, 2 :125.
- [Käs and Sackmann, 1991] Käs, J. and Sackmann, E. (1991). Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophys. J.*, 60 :825.
- [Ktistakis et al., 1996] Ktistakis, N., Brown, H., Waters, M., Sternweis, P., and Roth, M. (1996). Evidence that phospholipase d mediates adp ribosylation factor-dependent formation of golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.*, 134 :295.
- [Kummrow and Helfrich, 1991] Kummrow, M. and Helfrich, W. (1991). Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A*, 44 :8356.
- [Kuriyama et al., 2002] Kuriyama, R., Gustus, C., Terada, Y., Uetake, Y., and Matuliene, J. (2002). Cho1, a mammalian kinesin-like protein, interacts with f-actin and is involved in the terminal phase of cytokinesis. *J. Cell Biol.*, 156 :783.
- [Kwok and Evans, 1981] Kwok, R. and Evans, E. (1981). Thermoelasticity of large lecithin bilayer vesicles. *Biophys. J.*, 35 :637.
- [Landauer, 1988] Landauer, R. (1988). Motion out of noisy states. *J. Stat. Phys.*, 53 :233.
- [Lane and Allan, 1998] Lane, J. and Allan, V. (1998). Microtubule-based membrane movement. *Biochim. Biophys. Acta*, 1376 :27.

- [Lane and Allan, 1999] Lane, J. and Allan, V. (1999). Microtubule-based endoplasmic reticulum motility in *xenopus laevis* : activation of membrane-associated kinesin during development. *Mol. Biol. Cell*, 10 :1909.
- [Lang et al., 2002] Lang, M., Asbury, C., Shaevitz, J., and Block, S. (2002). An automated two-dimensional optical force clamp for single molecule studies. *Biophys. J.*, 83 :491.
- [Lantz and Miller, 1998] Lantz, V. and Miller, K. (1998). A class vi unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *drosophila* embryos. *J Cell Biol*, 140 :897.
- [Lawrence et al., 2004] Lawrence, C., Dawe, R., Christie, K., Cleveland, D., Dawson, S., Endow, S., Goldstein, L., Goodson, H., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R., McIntosh, J., Miki, H., Mitchison, T., Okada, Y., Reddy, A., Saxton, W., Schliwa, M., Scholey, J., Vale, R., Walczak, C., and Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.*, 167 :19.
- [Leduc et al., 2004] Leduc, C., Campas, O., Zeldovich, K., Roux, A., Jolimaitre, P., Bourel-Bonnet, L., Goud, B., Joanny, J.-F., Bassereau, P., and Prost, J. (2004). From the cover : Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 :17096.
- [Lee and Chen, 1988] Lee, C. and Chen, L. (1988). Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell*, 54 :37.
- [Lee et al., 2003] Lee, J., Shin, H., Ko, J., Choi, J., Lee, H., and Kim, E. (2003). Characterization of the movement of the kinesin motor kif1a in living cultured neurons. *J. Biol Chem.*, 278 :2624.
- [Lee et al., 2004] Lee, M., Miller, E., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the er and golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20 :87.
- [Leng et al., 2003] Leng, J., Egelhaaf, S., and Cates, M. (2003). Kinetics of the micelle-to-vesicle transition : Aqueous lecithin-bile salt mixtures. *Biophys. J.*, 85 :1624.
- [Leng et al., 2002] Leng, J., Egelhaaf, U., and Cates, E. (2002). Kinetic pathway of spontaneous vesicle formation. *Europhys. Lett.*, 59 :311.
- [Lighthill and Whitham, 1955] Lighthill, M. and Whitham, G. (1955). On kinematic waves : Ii a theory of traffic flow on long crowded roads. *Proc. R. Soc. London*, Ser. A 229 :317.
- [Ligon et al., 2004] Ligon, L., Tokito, M., Finklestein, J., Grossman, F., and Holzbaur, E. (2004). A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin i may coordinate motor activity. *J. Biol. Chem.*, 279 :19201.
- [Lipowsky et al., 2001] Lipowsky, R., Klumpp, S., and Nieuwenhuizen, T. (2001). Random walks of cytoskeletal motors in open and closed compartments. *Phys. Rev. Lett.*, 87 :108101.

Bibliographie

- [Lipowsky and Sackmann, 1995] Lipowsky, R. and Sackmann, E., editors (1995). *Structure and dynamics of membranes : from cells to vesicles*, volume 1A. Elsevier sciences B.V.
- [Lippincott-Schwartz et al., 1995] Lippincott-Schwartz, J., Cole, N., Marotta, A., Conrad, P., and Bloom, G. (1995). Kinesin is the motor for microtubule-mediated golgi-to-er membrane traffic. *J. Cell Biol.*, 128 :293.
- [Lippincott-Schwartz et al., 1990] Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J., Schweizer, A., Berger, E., Hauri, H., Yuan, L., and Klausner, R. (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the er in the presence of brefeldin a suggests an er recycling pathway. *Cell*, 60 :821.
- [Lippincott-Schwartz et al., 2000] Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T., and Hirschberg, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16 :557.
- [Lippincott-Schwartz et al., 1991] Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R. (1991). Brefeldin a's effects on endosomes, lysosomes, and the tgn suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell*, 67 :601.
- [Ludwig and Evans, 2000] Ludwig, F. and Evans, E. (2000). How strong is molecular anchoring in biomembranes? *BIF Futura*, 15 :96.
- [Mallik and Gross, 2004] Mallik, R. and Gross, S. (2004). Molecular motors : Strategies to get along. *Curr. Biol.*, 14 :R971.
- [Mandelkow and Mandelkow, 2002] Mandelkow, E. and Mandelkow, E.-M. (2002). Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.*, 12 :585.
- [Manneville, 1999] Manneville, J.-B. (1999). *Fluctuations de membranes actives*. PhD thesis, Université Paris 7, Institut Curie.
- [Manneville et al., 2001] Manneville, J.-B., Bassereau, P., Ramaswamy, S., and Prost, J. (2001). Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration. *Phys. Rev. E*, 64 :021908.
- [Martin, 2001] Martin, T. (2001). Pi(4,5)p2 regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13 :493.
- [Martinez and Goud, 1998] Martinez, O. and Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1404 :101.
- [Mathivet et al., 1996] Mathivet, L., Cribier, S., and Devaux, P. (1996). Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an ac electric field. *Biophys. J.*, 70 :1112.
- [Matteis et al., 2002] Matteis, M. D., Godi, A., and Corda, D. (2002). Phosphoinositides and the golgi complex. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14 :434.
- [McNew et al., 2000] McNew, J., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T., and Rothman, J. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in snare proteins. *Nature*, 407 :153.
- [McNiven, 1998] McNiven, M. (1998). Dynamin : a molecular motor with pinchase action. *Cell*, 94 :151.

- [Mellman and Warren, 2000] Mellman, I. and Warren, G. (2000). The road taken : past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, 100 :99.
- [Merkel et al., 1999] Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., and Evans, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force microscopy. *Nature*, 397 :50.
- [Meyhofer and Howard, 1995] Meyhofer, E. and Howard, J. (1995). The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 :574.
- [Miao et al., 1994] Miao, L., Seifert, U., Wortis, M., and Dobereiner, H. (1994). Budding transitions of fluid-bilayer vesicles : The effect of area-difference elasticity. *Phys. Rev. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 49 :5389.
- [Michalet et al., 1994] Michalet, X., Bensimon, D., and Fourcade, B. (1994). Fluctuating vesicles of nonspherical topology. *Phys. Rev. Lett.*, 72 :168.
- [Mickey and Howard, 1995] Mickey, B. and Howard, J. (1995). Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J. Cell Biol.*, 130 :909.
- [Mitchison, 1993] Mitchison, T. (1993). Localization of an exchangeable gtp binding site at the plus end of microtubules. *Science*, 261 :1044.
- [Mitchison and Kirschner, 1984] Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312 :237.
- [Méléard et al., 1992] Méléard, P., Faucon, J., Mitov, M., and Bothorel, P. (1992). Pulsed-light microscopy applied to the measurement of the bending elasticity of giant liposomes. *Europhys. Lett.*, 19 :267.
- [Mohandas and Evans, 1994] Mohandas, N. and Evans, E. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23 :787.
- [Morfini et al., 2002] Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., and Brady, S. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *Embo J*, 21 :281.
- [Moroz et al., 1997] Moroz, J., Nelson, P., Bar-Ziv, R., and Moses, E. (1997). Spontaneous expulsion of giant vesicles induced by laser tweezers. *Phys. Rev. Lett.*, 78 :386.
- [Muresan et al., 1996] Muresan, V., Godek, C., Reese, T., and Schnapp, B. (1996). Plus-end motors override minus-end motors during transport of squid axon vesicles on microtubules. *J. Cell Biol.*, 135 :383.
- [Muresan et al., 2001] Muresan, V., Stankewich, M., Steffen, W., Morrow, J., Holzbaur, E., and Schnapp, B. (2001). Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins : a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol. Cell*, 7 :173.
- [Murshid and Presley, 2004] Murshid, A. and Presley, J. (2004). Er-to-golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol. Life Sci.*, 61 :133.

Bibliographie

- [Mutz and Bensimon, 1991] Mutz, M. and Bensimon, D. (1991). Observation of toroidal vesicles. *Phys. Rev. A*, 43 :4525.
- [Nakagawa et al., 2000] Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K., and Hirokawa, N. (2000). A novel motor, kif13a, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with ap-1 complex. *Cell*, 103 :569.
- [Nedelec et al., 2001] Nedelec, F., Surrey, T., and Maggs, A. (2001). Dynamic concentration of motors in microtubule arrays. *Phys. Rev. Lett.*, 86 :3192.
- [Nedelec et al., 1997] Nedelec, F., Surrey, T., Maggs, A., and Leibler, S. (1997). Self-organization of microtubules and motors. *Nature*, 389 :305.
- [Niclas et al., 1996] Niclas, J., Allan, V., and Vale, R. (1996). Cell cycle regulation of dynein association with membranes modulates microtubule-based organelle transport. *J. Cell Biol.*, 133 :585.
- [Nishiyama et al., 2002] Nishiyama, M., Higuchi, H., and Yanagida, T. (2002). Chemomechanical coupling of the forward and backward steps of single kinesin molecules. *Nat. Cell Biol.*, 4 :790.
- [Nitta et al., 2004] Nitta, R., Kikkawa, M., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2004). Kif1a alternately uses two loops to bind microtubules. *Science*, 305 :678.
- [Nizak et al., 2003] Nizak, C., Monier, S., del Nery, E., Moutel, S., Goud, B., and Perez, F. (2003). Recombinant antibodies to the small gtpase rab6 as conformation sensors. *Science*, 300 :984.
- [Novick and Zerial, 1997] Novick, P. and Zerial, M. (1997). The diversity of rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9 :496.
- [Okada et al., 2003] Okada, Y., Higuchi, H., and Hirokawa, N. (2003). Processivity of the single-headed kinesin kif1a through biased binding to tubulin. *Nature*, 424 :574.
- [Okada and Hirokawa, 1999] Okada, Y. and Hirokawa, N. (1999). A processive single-headed motor : kinesin superfamily protein kif1a. *Science*, 283 :1152.
- [Okada and Hirokawa, 2000] Okada, Y. and Hirokawa, N. (2000). Mechanism of the single-headed processivity : diffusional anchoring between the k-loop of kinesin and the c terminus of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97 :640.
- [Olbrich et al., 2000] Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., and Evans, E. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophys. J.*, 79 :321.
- [Oprins et al., 1993] Oprins, A., Duden, R., Kreis, T., Geuze, H., and Slot, J. (1993). Beta-cop localizes mainly to the cis-golgi side in exocrine pancreas. *J. Cell Biol.*, 121 :49.
- [Palade, 1975] Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189 :347.
- [Parmeggiani et al., 2003] Parmeggiani, A., Franosch, T., and Frey, E. (2003). Phase coexistence in driven one-dimensional transport. *Phys. Rev. Lett.*, 90 :086601.

- [Parton et al., 1991] Parton, R., Dotti, C., Bacallao, R., Kurtz, I., Simons, K., and Prydz, K. (1991). ph-induced microtubule-dependent redistribution of late endosomes in neuronal and epithelial cells. *J Cell Biol*, 113 :261.
- [Paschal and Vallee, 1987] Paschal, B. and Vallee, R. (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein map 1c. *Nature*, 330 :181.
- [Pécreaux, 2004] Pécreaux, J. (2004). *Mesure du spectre de fluctuations de vésicules géantes par analyse de contour; application aux membranes passives et actives*. PhD thesis, Université Paris 6, Institut Curie.
- [Pécreaux et al., 2004] Pécreaux, J., Dobereiner, H., Prost, J., Joanny, J., and Bas-sereau, P. (2004). Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur Phys J E Soft Matter*, 13 :277.
- [Perez et al., 1999] Perez, F., Diamantopoulos, G., Stalder, R., and Kreis, T. (1999). Clip-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, 96 :517.
- [Peterson, 1992] Peterson, M. (1992). Linear response of the human erythrocyte to mechanical stress. *Phys. Rev. A*, 45 :4116.
- [Pfeffer, 1999] Pfeffer, S. (1999). Transport-vesicle targeting : tethers before snares. *Nat. Cell Biol.*, 1 :E17.
- [Philip and Scarlata, 2004] Philip, F. and Scarlata, S. (2004). Influence of membrane components in the binding of proteins to membrane surfaces. *Biochemistry*, 43 :11691.
- [Polishchuk et al., 2003] Polishchuk, E., Pentima, A. D., Luini, A., and Polishchuk, R. (2003). Mechanism of constitutive export from the golgi : bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains. *Mol. Biol. Cell*, 14 :4470.
- [Polishchuk et al., 2000] Polishchuk, R., Polishchuk, E., Marra, P., Saverio, A., Roberto, B., Luini, A., and Mironov, A. (2000). Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between golgi apparatus and plasma membrane. *J. Cell Biol.*, 148 :45.
- [Powers et al., 2002] Powers, T., Huber, G., and Goldstein, R. (2002). Fluid-membrane tethers : Minimal surfaces and elastic boundary layers. *Phys. Rev. E*, 65 :041901.
- [Prahlad et al., 1998] Prahlad, V., Yoon, M., Moir, R., Vale, R., and Goldman, R. (1998). Rapid movements of vimentin on microtubule tracks : kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J. Cell Biol.*, 143 :159.
- [Presley et al., 1997] Presley, J., Cole, N., Schroer, T., Hirschberg, K., Zaal, K., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Er-to-golgi transport visualized in living cells. *Nature*, 389 :81.
- [Presley et al., 1998] Presley, J., Smith, C., Hirschberg, K., Miller, C., Cole, N., Zaal, K., and Lippincott-Schwartz, J. (1998). Golgi membrane dynamics. *Mol. Biol Cell.*, 9 :1617.

Bibliographie

- [Presley et al., 2002] Presley, J., Ward, T., Pfeifer, A., Siggia, E., Phair, R., and Lippincott-Schwartz, J. (2002). Dissection of cop1 and arf1 dynamics in vivo and role in golgi membrane transport. *Nature*, 417 :187.
- [Prior et al., 2003] Prior, I., Muncke, C., Parton, R., and Hancock, J. (2003). Direct visualization of ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.*, 160 :165.
- [Prost and Bruinsma, 1996] Prost, J. and Bruinsma, R. (1996). Shape fluctuations of active membranes. *Europhys. Lett.*, 33 :321.
- [Ramaswamy et al., 2000] Ramaswamy, S., Prost, J., and Toner, J. (2000). Nonequilibrium fluctuations, travelling waves, and instabilities in active membranes. *Phys. Rev. Lett.*, 84 :3494.
- [Ramaswamy and Rao, 2001] Ramaswamy, S. and Rao, M. (2001). The physics of active membranes. *C. R. Acad. Sci. Paris, IV*, 2 :817.
- [Rambourg and Clermont, 1990] Rambourg, A. and Clermont, Y. (1990). Three-dimensional electron microscopy : structure of the golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol.*, 51 :189.
- [Rambourg et al., 1979] Rambourg, A., Clermont, Y., and Hermo, L. (1979). Three-dimensional architecture of the golgi apparatus in sertoli cells of the rat. *Am J Anat*, 154 :455.
- [Raphael and Waugh, 1996] Raphael, R. and Waugh, R. (1996). Accelerated inter-leaflet transport of phosphatidylcholine molecules in membranes under deformation. *Biophys. J.*, 71 :1374.
- [Rawicz et al., 2000] Rawicz, W., Olbrich, K., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.*, 79 :328.
- [Ray et al., 1993] Ray, S., Meyhofer, E., Milligan, R., and Howard, J. (1993). Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. *J. Cell Biol.*, 121 :1083.
- [Rice et al., 1999] Rice, S., Lin, A., Safer, D., Hart, C., Naber, N., Carragher, B., Cain, S., E.Pechatnikova, Wilson-Kubalek, E., Whittaker, M., Pate, E., Cooke, R., Taylor, E., Milligan, R., and Vale, R. (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*, 402 :778.
- [Rickard and Kreis, 1996] Rickard, J. and Kreis, T. (1996). Clips for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.*, 6 :178.
- [Robertson and Allan, 2000] Robertson, A. and Allan, V. (2000). Brefeldin a-dependent membrane tubule formation reconstituted in vitro is driven by a cell cycle-regulated microtubule motor. *Mol. Biol. Cell*, 11 :941.
- [Rogers and Gelfand, 2000] Rogers, S. and Gelfand, V. (2000). Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 :57.
- [Rogers et al., 1997] Rogers, S., Tint, I., Fanapour, P., and Gelfand, V. (1997). Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 :3720.

- [Romberg et al., 1998] Romberg, L., Pierce, D., and Vale, R. (1998). Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J. Cell Biol.*, 140 :1407.
- [Rosenfeld et al., 2003] Rosenfeld, S., Fordyce, P., Jefferson, G., King, P., and Block, S. (2003). Stepping and stretching. how kinesin uses internal strain to walk processively. *J. Biol. Chem.*, 278 :18550.
- [Rossier et al., 2003] Rossier, O., Cuvelier, D., Borghi, N., Puech, P., Derényi, I., Buguin, A., Nassoy, P., and Brochard-Wyart, F. (2003). Giant vesicles under flows : Extrusion and retraction of tubes. *Langmuir*, 19 :575.
- [Roth, 2004a] Roth, M. (2004a). New candidates for vesicle coat proteins. *Nat. Cell Biol.*, 6 :384.
- [Roth, 2004b] Roth, M. (2004b). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev*, 84 :699.
- [Rothman and Lenard, 1977] Rothman, J. and Lenard, J. (1977). Membrane asymmetry. *Science*, 195 :743.
- [Rousselet et al., 1994] Rousselet, J., Salome, L., Ajdari, A., and Prost, J. (1994). Directional motion of brownian particles induced by a periodic asymmetric potential. *Nature*, 370 :446.
- [Roux, 2004] Roux, A. (2004). *Tubes de membrane dans le trafic intracellulaire : aspects physiques et biologiques*. PhD thesis, Université Paris 7, Institut Curie.
- [Roux et al., 2002] Roux, A., Capello, G., Cartaud, J., Prost, J., Goud, B., and Bassereau, P. (2002). A minimal system allowing tubulation using molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 99 :5394.
- [Roux et al., 2005a] Roux, A., Cuvelier, D., Prost, J., Nassoy, P., Bassereau, P., and Goud, B. (2005a). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *accepted in EMBO J*.
- [Roux et al., 2005b] Roux, A., Leduc, C., Campàs, O., Cappello, G., Dévényi, I., Joanny, J.-F., Prost, J., Goud, B., and Bassereau, P. (2005b). Nanotubes fluides et trafic intracellulaire. *Image de la physique*.
- [Rustom et al., 2004] Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 303 :1007.
- [Sablin, 2000] Sablin, E. (2000). Kinesins and microtubules : their structures and motor mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 :35.
- [Sablin and Fletterick, 2004] Sablin, E. and Fletterick, R. (2004). Coordination between motor domains in processive kinesins. *J. Biol. Chem.*, 279 :15707.
- [Sackmann, 1989] Sackmann, E. (1989). Molecular and global structure and dynamics of membranes and lipid bilayers. *Can. J. Phys.*, 68 :999.
- [Sackmann, 1994] Sackmann, E. (1994). The seventh datta lecture. membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Lett.*, 346 :3.

Bibliographie

- [Safran, 1994] Safran, S. (1994). *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes*. Addison Wesley.
- [Sakamoto et al., 2005] Sakamoto, R., Byrd, D., Brown, H., Hisamoto, N., Matsumoto, K., and Jin, Y. (2005). The caenorhabditis elegans unc-14 run domain protein binds to the kinesin-1 and unc-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. *Mol. Biol. Cell*, 16 :483.
- [Salmon et al., 1984] Salmon, E., Leslie, R., Saxton, W., Karow, M., and McIntosh, J. (1984). Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos : analysis using a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J. Cell Biol.*, 99 :2165.
- [Sammak and Borisy, 1988] Sammak, P. and Borisy, G. (1988). Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature*, 332 :724.
- [Sandre et al., 1999] Sandre, O., Moreaux, L., and Brochard-Wyart, F. (1999). Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 :10591.
- [Sannerud et al., 2003] Sannerud, R., Saraste, J., and Goud, B. (2003). Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route : pathways and machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15 :438.
- [Saxton and Jacobson, 1997] Saxton, M. and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking : applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26 :373.
- [Schekman and Orci, 1996] Schekman, R. and Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science*, 271 :1526.
- [Schief and Howard, 2001] Schief, W. and Howard, J. (2001). Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol*, 13 :19.
- [Schliwa and Woehlke, 2003] Schliwa, M. and Woehlke, G. (2003). Molecular motors. *Nature*, 422 :759.
- [Schmidt et al., 1999] Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A., Witke, W., Huttner, W., and Soling, H. (1999). Endophilin i mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, 401 :133.
- [Schnapp, 2003] Schnapp, B. (2003). Trafficking of signaling modules by kinesin motors. *J. Cell Sci.*, 116 :2125.
- [Schneider et al., 1984] Schneider, M., Jenkins, J., and Webb, W. (1984). Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J. Phys.*, 45 :1457.
- [Schnitzer and Block, 1997] Schnitzer, M. and Block, S. (1997). Kinesin hydrolyses one atp per 8 nm step. *Nature*, 388 :386.
- [Schnitzer et al., 2000] Schnitzer, M., Visscher, K., and Block, S. (2000). Force production by single kinesin motors. *Nat. Cell Biol.*, 2 :718.
- [Scholey et al., 1989] Scholey, J., Heuser, J., Yang, J., and Goldstein, L. (1989). Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. *Nature*, 338 :355.

- [Scholey et al., 1985] Scholey, J., Porter, M., Grissom, P., and McIntosh, J. (1985). Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature*, 318 :483.
- [Sciaky et al., 1997] Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K., Cole, N., Moreira, J., Terasaki, M., Siggia, E., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin a visualized in living cells. *J. Cell Biol.*, 139 :1137.
- [Seifert, 1991] Seifert, U. (1991). Vesicles of toroidal topology. *Phys. Rev. Lett.*, 66 :2404.
- [Seifert, 1997] Seifert, U. (1997). Configurations of fluid membranes and vesicles. *Advances in Physics*, 46 :13–137.
- [Seifert, 1999] Seifert, U. (1999). Fluid membranes in hydrodynamic flow fields : Formalism and an application to fluctuating quasispherical vesicles in shear flow. *Eur. Phys. J. B*, 8 :405.
- [Seiler et al., 2000] Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G., and Schliwa, M. (2000). Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nat. Cell Biol.*, 2 :333.
- [Seitz et al., 2002] Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E., Song, Y., and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and map2c. *EMBO J.*, 21 :4896.
- [Setou et al., 2000] Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin superfamily motor protein kif17 and mlin-10 in nmda receptor-containing vesicle transport. *Science*, 288 :1796.
- [Setou et al., 2002] Setou, M., Seog, D., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., and Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein grip1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*, 417 :83.
- [Shahidzadeh et al., 1998] Shahidzadeh, N., Bonn, D., Aguerre-Chariol, O., and Meunier, J. (1998). Large déformations of giant floppy vesicles in shear flow. *Phys. Rev. Lett.*, 81 :4268.
- [Shechter, 1993] Shechter, E. (1993). *Biochimie et biophysique de la membrane*. Masson, 2ème édition.
- [Simon et al., 1996] Simon, J., Ivanov, I., Adesnik, M., and Sabatini, D. (1996). The production of post-golgi vesicles requires a protein kinase c-like molecule, but not its phosphorylating activity. *J Cell Biol*, 135 :355.
- [Simon et al., 1998] Simon, J., Morimoto, T., Bankaitis, V., Gottlieb, T., Ivanov, I., Adesnik, M., and Sabatini, D. (1998). An essential role for the phosphatidylinositol transfer protein in the scission of coatomer-coated vesicles from the trans-golgi network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95 :11181.
- [Simons and Ikonen, 1997] Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 :569.
- [Simons and VanMeer, 1988] Simons, K. and VanMeer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27 :6197.

Bibliographie

- [Singer and Nicolson, 1972] Singer, S. and Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 :720.
- [Smith and Oldfield, 1984] Smith, R. and Oldfield, E. (1984). Dynamic structure of membranes by deuterium nmr. *Science*, 225 :280.
- [Solon, 2004] Solon, J. (2004). *Intéactions entre membranes lipidiques chargées : Instabilités, déformations et mouvement*. PhD thesis, Université Paris 6, Institut Curie.
- [Solon et al., 2005] Solon, J., Pécréaux, J., Girard, P., Fauré, M.-C., Prost, J., and Bassereau, P. (2005). Negative tension induced by membrane fusion. *in preparation*.
- [Soumpasis, 1983] Soumpasis, D. (1983). Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J*, 41 :95.
- [Springer et al., 1999] Springer, S., Spang, A., and Schekman, R. (1999). A primer on vesicle budding. *Cell*, 97 :145.
- [Sprong et al., 2001] Sprong, H., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001). How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2 :504.
- [Stephens and Pepperkok, 2001] Stephens, D. and Pepperkok, R. (2001). Illuminating the secretory pathway : when do we need vesicles? *J. Cell Sci.*, 114 :1053.
- [Stow and Heinmann, 1998] Stow, J. and Heinmann, K. (1998). Vesicle budding on golgi membranes : regulation by g protein and myosin motors. *Biochem. Biophys. Acta*, 1404 :161.
- [S.Uemura and Ishiwata, 2003] S.Uemura and Ishiwata, S. (2003). Loading direction regulates the affinity of adp for kinesin. *10, Nat. Struct. Biol.* :308.
- [Surrey et al., 1998] Surrey, T., Elowitz, M., Wolf, P., Yang, F., Nedelec, F., Shokat, K., and Leibler, S. (1998). Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 :4293.
- [Surrey et al., 2001] Surrey, T., Nedelec, F., Leibler, S., and Karsenti, E. (2001). Physical properties determining self-organization of motors and microtubules. *Science*, 292 :1167.
- [Svetina and Zeks, 1989] Svetina, S. and Zeks, B. (1989). Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red blood cells. *Eur. Biophys. J.*, 17 :101.
- [Svetina et al., 1998] Svetina, S., Zeks, B., Waugh, R., and Raphael, R. (1998). Theoretical analysis of the effect of the transbilayer movement of phospholipid molecules on the dynamic behavior of a microtubule pulled out of an aspirated vesicle. *Eur. Biophys. J.*, 27 :197.
- [Svoboda et al., 1994] Svoboda, K., Mitra, P., and Block, S. (1994). Fluctuation analysis of motor protein movement and single enzyme kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :11782.
- [Svoboda et al., 1993] Svoboda, K., Schmidt, C., Schnapp, B., and Block, S. (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365 :721.

- [Swanson et al., 1987] Swanson, J., Burke, E., and Silverstein, S. (1987). Tubular lysosomes accompany stimulated pinocytosis in macrophages. *J Cell Biol*, 104 :1217.
- [Tabony and Job, 1990] Tabony, J. and Job, D. (1990). Spatial structures in microtubular solutions requiring a sustained energy source. *Nature*, 346 :448.
- [Tai et al., 1999] Tai, A., Chuang, J., Bode, C., Wolfrum, U., and Sung, C. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain tctex-1. *Cell*, 97 :877.
- [Tang et al., 2002] Tang, N., Lin, T., and Ostap, E. (2002). Dynamics of myo1c (myosin-ibeta) lipid binding and dissociation. *J. Biol Chem.*, 277 :42763.
- [Terasaki et al., 1986] Terasaki, M., Chen, L., and Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.*, 103 :1557.
- [Terasaki et al., 1984] Terasaki, M., Song, J., Wong, J., Weiss, M., and Chen, L. (1984). Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell*, 38 :101.
- [Thorn et al., 2000] Thorn, K., Ubersax, J., and Vale, R. (2000). Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J. Cell Biol.*, 151 :1093.
- [Toyoshima et al., 1992] Toyoshima, I., Yu, H., Steuer, E., and Sheetz, M. (1992). Kinectin, a major kinesin-binding protein on er. *J. Cell Biol.*, 118 :1121.
- [Tozeren et al., 1982] Tozeren, A., Skalak, R., Sung, K., and Chien, S. (1982). Viscoelastic behavior of erythrocyte membrane. *Biophys. J.*, 39 :23.
- [Uemura et al., 2002] Uemura, S., Kawaguchi, K., Yajima, J., Edamatsu, M., Toyoshima, Y., and Ishiwata, S. (2002). Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99 :5977.
- [Upadhyaya and Sheetz, 2004] Upadhyaya, A. and Sheetz, M. (2004). Tension in tubulovesicular networks of golgi and endoplasmic reticulum membranes. *Biophys. J.*, 86 :2923.
- [Vale, 1987] Vale, R. (1987). Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 3 :347.
- [Vale, 2003] Vale, R. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 112 :467.
- [Vale et al., 1996] Vale, R., Funatsu, T., Pierce, D., Romberg, L., Harada, Y., and Yanagida, T. (1996). Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*, 380 :451.
- [Vale and Hotani, 1988] Vale, R. and Hotani, H. (1988). Formation of membrane networks in vitro by kinesin-driven microtubule movement. *J. Cell Biol.*, 107 :2233.
- [Vale and Milligan, 2000] Vale, R. and Milligan, R. (2000). The way things move : looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288 :88.

Bibliographie

- [Vale et al., 1985a] Vale, R., Reese, T., and Sheetz, M. (1985a). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42 :39.
- [Vale et al., 1985b] Vale, R., Schnapp, B., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T., and Sheetz, M. (1985b). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell*, 43 :623.
- [Vallee and Sheetz, 1996] Vallee, R. and Sheetz, M. (1996). Targeting of motor proteins. *Science*, 271 :1539.
- [van Meer and Lisman, 2002] van Meer, G. and Lisman, Q. (2002). Sphingolipid transport : Rafts and translocators. *J. Biol. Chem.*, 277 :25855.
- [VanMeer, 1993] VanMeer, G. (1993). Transport and sorting of membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5 :671.
- [VanMeer and Sprong, 2004] VanMeer, G. and Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16 :373.
- [Venier et al., 1994] Venier, P., Maggs, A., Carlier, M., and Pantaloni, D. (1994). Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations [published erratum appears in j biol chem 1995 jul 14 ;270(28) :17056]. *J. Biol. Chem.*, 269 :13353.
- [Verhey et al., 1998] Verhey, K., Lizotte, D., Abramson, T., Barenboim, L., Schnapp, B., and Rapoport, T. (1998). Light chain-dependent regulation of kinesin's interaction with microtubules. *J. Cell Biol.*, 143 :1053.
- [Verhey et al., 2001] Verhey, K., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B., Rapoport, T., and Margolis, B. (2001). Cargo of kinesin identified as jip scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J. Cell Biol.*, 152 :959.
- [Vinogradova et al., 2004] Vinogradova, M., Reddy, V., Reddy, A., Sablin, E., and Fletterick, R. (2004). Crystal structure of kinesin regulated by ca²⁺-calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 279 :23504.
- [Visscher et al., 1999] Visscher, K., Schnitzer, M., and Block, S. (1999). Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, 400 :184.
- [Waterman-Storer et al., 1995] Waterman-Storer, C., Gregory, J., Parsons, S., and Salmon, E. (1995). Membrane/microtubule tip attachment complexes (tacs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase xenopus egg extracts. *J. Cell Biol.*, 130 :1161.
- [Waterman-Storer and Salmon, 1998] Waterman-Storer, C. and Salmon, E. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.*, 8 :798.
- [Waugh, 1982a] Waugh, R. (1982a). Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. i. analysis. *Biophys. J.*, 38 :19.
- [Waugh, 1982b] Waugh, R. (1982b). Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. ii. experiments. *Biophys. J.*, 38 :29.
- [Waugh and Hochmuth, 1987] Waugh, R. and Hochmuth, R. (1987). Mechanical equilibrium of thick, hollow, liquid membrane cylinders. *Biophys J*, 52 :391.

- [Waugh et al., 2001] Waugh, R., Mantalaris, A., Bauserman, R., Hwang, W., and Wu, J. (2001). Membrane instability in late-stage erythropoiesis. *Blood*, 97 :1869.
- [Waugh et al., 1992] Waugh, R., Song, J., Svetina, S., and Zeks, B. (1992). Local and nonlocal curvature elasticity in bilayer membranes by tether formation from lecithin vesicles. *Biophys. J.*, 61 :974.
- [Weigert et al., 1999] Weigert, R., Silletta, M., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., A., C., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K., Mironov, A., Luini, A., and Corda, D. (1999). Ctbp/bars induces fission of golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature*, 402 :429.
- [White et al., 1999] White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., and Stelzer, E. (1999). Rab6 coordinates a novel golgi to er retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.*, 147 :743.
- [Wintz et al., 1996] Wintz, W., Döbereiner, H.-G., and Seifert, U. (1996). Starfish vesicles. *Europhys. Lett.*, 33 :403.
- [Woehlke and Schliwa, 2000] Woehlke, G. and Schliwa, M. (2000). Walking on two heads : the many talents of kinesin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1 :50.
- [Wood et al., 1991] Wood, S., Park, J., and Brown, W. (1991). Brefeldin a causes a microtubule-mediated fusion of the trans-golgi network and early endosomes. *Cell*, 67 :591.
- [Wozniak et al., 2004] Wozniak, M., Milner, R., and Allan, V. (2004). N-terminal kinesins : many and various. *Traffic*, 5 :400.
- [Wu et al., 2002] Wu, X., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J., Matesic, L., Copeland, N., Jenkins, N., and J.A. Hammer, r. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-va. *Nat. Cell Biol.*, 4 :271.
- [Xu and Döbereiner, 2000] Xu, L. and Döbereiner, H.-G. (2000). Micromanipulation of tubular vesicles. In Luisi, P. and Walde, P., editors, *Giant Vesicles*, volume John Wiley & Sons, Inc., Ascona (Switzerland), page 181.
- [Yanagida et al., 1984] Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K., and Oosawa, F. (1984). Direct observation of motion of single f-actin filaments in the presence of myosin. *Nature*, 307 :58.
- [Yang et al., 1989] Yang, J., Laymon, R., and Goldstein, L. (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by dna sequence and microtubule binding analyses. *Cell*, 56 :879.
- [Yildiz et al., 2004] Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R., and Selvin, P. (2004). Kinesin walks hand-over-hand. *Nat. Cell Biol.*, 303 :676.
- [Young et al., 1995] Young, E., Berliner, E., Mahtani, H., Perez-Ramirez, B., and Gelles, J. (1995). Subunit interactions in dimeric kinesin heavy chain derivatives that lack the kinesin rod. *J. Biol. Chem.*, 270 :3926.
- [Zhelev et al., 1994] Zhelev, D., Needham, D., and Hochmuth, R. (1994). A novel micropipet method for measuring the bending modulus of vesicle membranes. *Biophys. J.*, 67 :720.

Résumé

Les tubes de membrane sont omniprésents dans les cellules vivantes eucaryotes. Ce sont des structures très dynamiques qui permettent en particulier la communication entre les différents compartiments de la cellule. Pour comprendre les mécanismes impliqués dans le trafic intracellulaire, il paraît essentiel d'isoler le rôle des différents constituants impliqués. Dans ce but, un système minimal qui permet de mimer *in vitro* les différentes étapes d'extraction, de croissance et d'arrêt des tubes de membrane avec des éléments purifiés ou artificiels (kinésines, microtubules, vésicules géantes unilamellaires) a été utilisé. La comparaison des résultats expérimentaux avec ceux obtenus par une analyse théorique du système a ainsi permis de caractériser de façon complète ces différentes étapes. Nous avons notamment montré l'existence d'un seuil de formation de tubes qui dépend essentiellement de deux paramètres non locaux supramoléculaires : la tension de membrane et la quantité de kinésines à la surface des vésicules. Lorsque le tube est formé, nous avons évalué le nombre de moteurs qui le tirent et montré qu'ils s'accumulent de façon dynamique au bout du tube. De la mesure de la longueur caractéristique d'accumulation, nous avons déduit un paramètre moléculaire : le taux d'attachement des kinésines sur un microtubule dans une géométrie proche de celle observée *in vivo*. Enfin, nous avons mis en évidence un phénomène d'oscillations liées au comportement collectif de moteurs processifs pour des tubes très longs. Ce système, bien que simplifié, permet d'apporter une nouvelle approche du trafic intracellulaire, en proposant des mécanismes physiques qui sont souvent masqués, dans les cellules, par des mécanismes moléculaires.

Abstract

Membrane tubes are ubiquitous in eukaryotic cells. They are very dynamical structures which especially allow communication between organelles in cells. To understand the mechanisms involved in intracellular traffic, it seems essential to isolate the role of the different components. To do that, we used a minimal system mimicking the different steps of formation, elongation and arrest of a membrane tube *in vitro* with purified components (kinesins, microtubules, giant unilamellar vesicles). The comparison between experimental results and a theoretical analysis allowed a complete characterization of these different steps. First, we demonstrated the existence of a threshold in tube formation which depends basically on two parameters : the membrane tension and the surface density of motors on the vesicle. Then, for a tube which has already been pulled, we evaluated the number of motors which are effectively pulling at the tube tip and showed that there is a dynamical accumulation of these motors. From the characteristic length of accumulation, we deduced a molecular parameter : the binding rate of kinesin onto microtubules in a geometry close to the *in vivo* situation. Finally, for very long tubes, we observed some oscillations which are linked to a collective behavior of processive molecular motors. Even if this minimal system is simplified, it gives a new approach of the intracellular traffic by suggesting physical mechanisms which are often, in cells, hidden by molecular mechanisms.