



Systèmes biomimétiques pour l'étude du changement de forme cellulaire

Fabrice Valentino

► To cite this version:

Fabrice Valentino. Systèmes biomimétiques pour l'étude du changement de forme cellulaire. Bio-physique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCC208 . tel-01788669

HAL Id: tel-01788669

<https://theses.hal.science/tel-01788669>

Submitted on 9 May 2018

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

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



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE

—
UNIVERSITE PARIS DIDEROT

Spécialité :

Interface Physique-Biologie

Présentée par

Fabrice Valentino

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 7

Sujet de la thèse :

**Systèmes biomimétiques pour
l'étude du changement de forme cellulaire**

Thèse soutenue le 27 Septembre 2016 devant le jury composé de

M. Clément CAMPILLO,
M. Laurent LIMOZIN,
M. Carlos MARQUES,
Mme Cécile SYKES,
M. Gilles TESSIER,

Co-directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Directrice de thèse
Président du jury

Remerciements

Avant toute chose, j'aimerais remercier tous les enseignants qui m'ont amené jusqu'ici : mes instituteurs des écoles de Boiry-Saint-Martin et Boiry-Sainte-Rictrude, mes professeurs du collège F. Mitterrand, mes professeurs du lycée M. Robespierre, mes professeurs du lycée Louis-le-Grand, ainsi que mes professeurs de l'ENS Cachan. Grâce à eux, j'ai bénéficié d'un excellent enseignement public qui m'a permis de m'ouvrir aux lettres et aux sciences.

Grâce à cet enseignement, j'ai pu ensuite m'initier à la recherche dans différents laboratoires (F. Darchen, P. Chenevier, V. Artero, A. Stroock) pour finalement être accueilli par Cécile il y a un peu plus de 3 ans déjà. Merci à toi de m'avoir fait confiance pour commencer ma thèse au sein de l'institut Curie, mais surtout pour avoir su m'accompagner, et me pousser tout au long de ces années. Les deux premières (consacrées presque exclusivement à régler le montage optique) furent assurément les plus rudes (mes colocs se souviendront peut-être des gâteaux du désespoir après une journée de manip ratées ...), mais ces efforts ont été récompensés. L'arrivée de Clément m'a également beaucoup apporté pour solutionner les problèmes rencontrés sur le montage optique, et sa disponibilité m'a été d'une grande aide pour pouvoir échanger en permanence sur l'avancement de mes travaux : Merci à vous deux !

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse : mes rapporteurs, Laurent Limozin et Carlos Marques, ainsi que Gilles Tessier qui a accepté le rôle d'examineur.

Les principaux résultats de cette thèse ont pu être obtenus grâce à ceux qui ont imaginé et construit mon montage optique initial. Je veux parler du grand Timo, aidé de Joël, Mathias, et Rémi de l'atelier mécanique. Un grand merci également à Pierre Sens, pour son active participation à l'article sur les tubes tendus, et sur toutes nos discussions à propos des fluctuations.

Tout au long de cette thèse, j'ai pu compter sur le soutien des différents membres de mon équipe : Julie (pour ses chocolats ! et aussi un peu pour avoir de l'aide en biochimie), Valentina-Majdouline (pour leurs 'social events', les gâteaux divers et variés, et leur bonne humeur communicative), Patricia (pour sa glace !), Rodrigo (et ses biscuits péruviens), et les petits nouveaux Antoine et Camille à qui je souhaite de s'épanouir tout au long de leur thèse. Du côté des

anciens, un grand merci à Kevin, Wylie, et mes petits stagiaires Margaux et Lucas.

Au delà de mon équipe, je tiens à remercier ceux avec qui j'ai pu partager mon bureau (ainsi que mes goûts musicaux) : Stéphanie (grande amatrice de chocolat), Mathieu (maître en désossage de vieux ordi), puis Camille (Excel Master). Plus largement, je souhaiterais remercier l'ensemble des gens que j'ai pu côtoyer au sein de cette unité : Brigitte, Laurence, John, Fahima, Francis, Simon, Guillaume, Sarah, Isabelle, Mélanie, Marie, Perrine, Thanh, Quentin, Thibaut, Maryam, Kodjo...

En dehors du laboratoire, il me faut aussi mettre en avant quelques amis qui ont compté ces dernières années : mes colocs Ara, Nowie, Mimile, Mimeline, Trolin', Arianounette, Zenithm, Pingou, Marionette, Cpa, mon petit club de nageurs-mangeurs-de-kouign-amann Mémé, Clairette, Flavinou, Xixi, ainsi que Nanaëlle, ma fidèle partenaire de ciné !

Avant de clore cette partie, je voudrais remercier ma famille, et en particulier mes parents qui ont tenu à relire et corriger mon manuscrit : merci maman, merci papa !

Fabrice

Pour être (je l'espère), tout à fait complet, je souhaiterai adresser mes derniers remerciements au RER B, qui m'a accompagné tout au long de ces années : il est toujours aussi agréable de voyager avec un soupçon d'imprévisible. Un grand merci à l'Administration dans son ensemble pour son efficacité. Et enfin un dernier mot pour mon métatarse I gauche : tiens bon !

Poussinet

Table des matières

<i>Introduction générale</i>	11
<u>Chapitre I</u> – Les cellules ne sont pas toujours rondes !	13
1) Cellules et membranes	
a- La théorie cellulaire	14
b- La membrane des cellules eucaryotes	16
c- Changements de forme	18
2) Un système biomimétique : le liposome	
a- Le liposome	20
b- Membranes modèles	22
c- Mesures des propriétés mécaniques des membranes	24
d- Déformation passive d'une membrane modèle	26
3) Une structure cellulaire organisée : le cytosquelette	
a- L'actine	29
b- Dynamique de polymérisation <i>in vitro</i>	30
c- Protéines de régulation	33
d- Les myosines	38
4) Cytosquelette et changements de forme cellulaire	
a- Le cortex cellulaire	42
b- Le lamellipode	43
c- Tubes de membrane sous tendus par des filaments d'actine	43
5) Conclusion	45
<u>Chapitre II</u> – Systèmes biomimétiques pour l'étude de la déformation de la membrane plasmique	47
1) Reconstitution d'un cortex d'actine sur un liposome	
a- Diriger la polymérisation	48
b- Observations sur un cortex externe	50
c- Observations sur un cortex interne	51

2) Nano-tube de membrane	
a- Physique du tube	53
b- Principe de la pince optique	54
c- Mesures de force	55
3) Conclusion	56
Chapitre III – Mesures à haute résolution de fluctuations de nano-tubes de membrane	57
1) Commande de la pince	
a- Miroirs galvanométriques	62
b- SLM	62
c- Amplificateur acousto-optique (ou AOD)	63
2) Montage initial	64
3) Détection par QPD	
a- Technique du ‘Back focal plane’	65
b- Calibration de la QPD	67
4) Vérifications et améliorations du dispositif	
a- Distribution de positions	70
b- Diminution du bruit	71
c- PSD et hautes fréquences	72
d- Alignement des optiques	75
5) Validation du montage	
a- Distribution de positions	77
b- PSD et hautes fréquences	79
6) Mesures de modules de courbure de membranes modèles	
a- Protocole expérimental	80
b- Résultats	83
7) Mesures de fluctuation	
a- Différences de fluctuations entre bille libre puis attachée	85
b- Régime linéaire	86
c- Etude des comportements de PSD entre bille libre puis attachée	88
d- Etude de PSD de billes libres	89
e- Caractérisation des fluctuations de billes attachées	90

f- Et sur l'axe y ?	94
8) Conclusion sur les effets physiques observés	
a- A basses fréquences	97
b- A hautes fréquences	97
9) Polymérisation et tube de membrane	98
10) Discussion	99
<u>Chapitre IV</u> – Tubes basse tension, et polymérisation d'actine	99
1) Tubes basse tension	
a- Introduction et présentation du montage	102
b- Caractérisation des tubes basse tension	106
c- Modélisation	109
d- Discussion	112
2) Etude de la polymérisation d'actine dans le cadre d'un cortex <i>in vitro</i>	
a- s-pVCA et activité	113
b- Observations de la polymérisation d'actine	115
c- Observation en continu	117
d- Etude des effets de la myosine VI sur la contraction du réseau	118
e- Discussion	120
3) Conclusion	122
<i>Conclusion générale</i>	123
Annexes	
A- Solutions tampon	126
B- Protocole d'électroformation	129
C- Calibration de la QPD (Code)	130
D- Calcul de la PSD (Code)	132
E- Ajustements de la PSD (Code)	135

F- Analyse d'image (Code)	139
G- Article	143
H- Etude théorique des PSDs (Pierre Sens)	144
I- Calcul de l'amplitude des fluctuations d'une corde tendue	146
J- Formations Ecole Doctorale – Physique Île de France	152
K- Revue	153
Bibliographie	155

Introduction générale

Dans les *Carnets*, Léonard de Vinci écrivait « Le mouvement est le principe de toute vie ». La mise en mouvement, pour un poète, un créateur, un artiste, un ingénieur, c'est donner vie à son œuvre. C'est pour se rapprocher aussi près que possible de cette ambition démiurgique que de Vinci étudia par exemple le vol des oiseaux, ou l'anatomie de divers êtres vivants.

A plus petite échelle, trop petite pour être observée au début du XVI^{ème}, la cellule, qui constitue l'unité élémentaire de la majorité des êtres vivants, est capable de se mouvoir dans son milieu. Par exemple, elle peut migrer individuellement pour se nourrir, ou collectivement pour organiser la morphogenèse des organes. L'approche biophysique développée au laboratoire est d'étudier le squelette des cellules, à l'origine des déplacements qui les animent. Ce squelette, qui sous-tend la membrane plasmique des cellules est constitué d'un réseau complexe de filaments dynamiques dont l'actine.

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressé à la déformation membranaire dans une géométrie reproduisant en partie le phénomène d'endocytose, qui permet de transporter des éléments externes à la cellule vers l'intérieur.

Les deux premiers chapitres présentent les notions essentielles pour la suite. En particulier, en partant de l'observation de la richesse des formes cellulaires et de leur dynamique, on abordera les différents composants du squelette cellulaire *in vivo*. Ensuite on étudiera les modèles *in vitro* qui reproduisent certaines déformations de la membrane plasmique avec l'action du squelette d'actine.

Le troisième chapitre porte sur l'étude de nano-tubes de membrane formés à haute tension. J'insisterai sur les développements que j'ai apportés au dispositif de mesure, et qui nous donnent accès pour la première fois aux fluctuations de ce type de tube. Un article est à ce jour en phase de soumission à ce propos (Annexe G).

Le dernier chapitre présente la caractérisation de tubes de membrane créés à basse tension ainsi que les expériences préliminaires à la polymérisation

de l'actine sur ces tubes, en particulier certains effets dûs à la polymérisation d'actine *in vitro* en présence d'un moteur moléculaire : la myosine VI.

Chapitre I

Les cellules ne sont pas toujours rondes !

Sommaire :

- 1) Cellules et membranes
 - a- La théorie cellulaire
 - b- La membrane des cellules eucaryotes
 - c- Changements de forme
- 2) Théorie des membranes lipidiques
 - a- Le liposome
 - b- Membranes modèles
 - c- Mesures des propriétés des membranes
 - d- Déformation passive d'une membrane modèle
- 3) Une structure cellulaire organisée : le cytosquelette
 - a- L'actine
 - b- Dynamique de polymérisation *in vitro*
 - c- Protéines de régulation
 - d- Les myosines
- 4) Cytosquelette et changements de forme cellulaire
 - a- Le cortex cellulaire
 - b- Le lamellipode
 - b- Tubes de membrane
- 5) Conclusion

La biologie, concaténation des mots grecs terme **βίος** (*bios* – « vie ») et **λογος** (*logos* – « discours, étude ») est le nom donné par le Chevalier de Lamarck dans *Hydrogéologie*, publié en 1802 (conservé à la bibliothèque centrale du Muséum d'histoire naturelle), à la science ayant pour unique mais vaste objet « tout ce qui est généralement commun aux végétaux et aux animaux comme toutes les facultés qui sont propres à chacun de ces êtres ». Dans ce chapitre, je présenterai certains aspects structurels de la cellule, qui est la brique élémentaire de la biologie au même titre que l'atome l'est pour la physique. Puis, en se limitant aux cellules eucaryotes (qui possèdent un vrai noyau), on observera que leurs formes, très variables, ne sont pas seulement déterminées par la physique de leur contour, la membrane plasmique, mais aussi par le squelette interne de la cellule ou cytosquelette (**κυτος** *cyto* – « creux » et squelette). La compréhension de ces différentes formes devra donc passer par une étude plus poussée du contenu cellulaire, en particulier du cytosquelette.

1) Cellules et membranes

a) La théorie cellulaire

C'est au XVII^e siècle que Antoni van Leeuwenhoek construit l'un des tous premiers microscopes (Fig 1.1 tirée de [Leeuwenhoek, 2012]), lui permettant d'observer, non pas des objets macroscopiques comme Galilée et sa lunette astronomique découverte, elle, à la toute fin du XVI^e, mais de voir pour la première fois des objets microscopiques de la taille d'une centaine de microns.

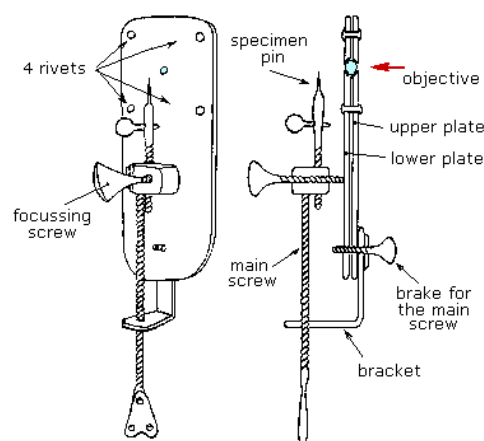


Figure 1.1 Schéma de principe du microscope développé par Leeuwenhoek.
L'objectif était constitué d'une goutte de verre de l'ordre du millimètre [Leeuwenhoek, 2012].

Les premiers objets vivants à avoir été observés et décrits ainsi appartiennent au groupe des protozoaires, du grec **πρωτος** (*protos* – « premier ») et **ζωον** (*zôon* – « animal »).

C'est en 1665, en étudiant le liège et plus particulièrement sa structure très cloisonnée (Fig 1.2, tirée de [Robert Hooke, 2006]) que Robert Hooke va créer le terme 'cellule' du latin **cellula** « petite chambre de moine ».

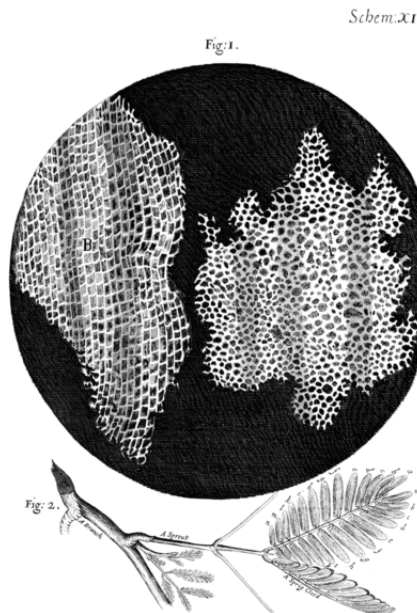


Figure 1.2 Observation de liège au microscope. [Robert Hooke, 2006]

L'observation de ces structures dans le règne végétal puis dans le règne animal par Théodor Schwann fut le point de départ de la théorie cellulaire [Amar-Costesec, 2016]. La cellule devient alors la brique élémentaire du vivant, les êtres vivants étant forcément constitués d'une ou plusieurs cellules. La découverte de la reproduction cellulaire par division, par Rudolf Virchow et Robert Remak, symbolisée par la maxime **Omnis cellula e cellula**, « chaque cellule est issue d'une autre cellule » achève la théorie cellulaire [Rosen, 2009].

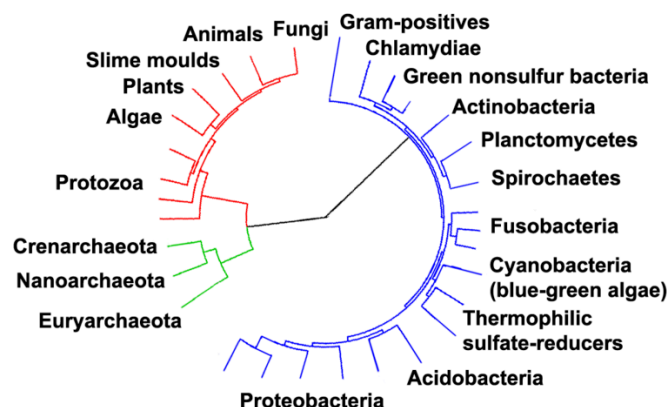


Figure 1.3 Arbre phylogénétique simplifié obtenu en comparant l'alignement de 31 familles de protéines universelles sur 191 espèces. Les archées (en vert) et les bactéries (en bleu) sont des procaryotes. Les eucaryotes sont en rouge. Un nœud entre deux branches symbolise un ancêtre commun. Plus le nœud est près du centre du dessin, plus l'ancêtre commun entre ces deux espèces est lointain. [Ciccarelli, 2006]

Une filiation peut être établie entre cellules en évaluant leur degré de parenté en classant leurs différences (par exemple par comparaison de l'alignement de protéines de la même famille), et on peut alors tracer un arbre phylogénétique (Fig 1.3, tirée de [Ciccarelli, 2006]), où chaque nœud représente un ancêtre commun aux branches qui lui sont rattachées. Plus cet ancêtre commun est âgé, plus grandes sont les différences entre les espèces actuelles qui en descendent. Pour la suite de ce chapitre introductif, on se restreindra aux cellules eucaryotes qui se seraient différenciées des autres cellules il y a quelques millions d'années [Buick, 2010].

b) La membrane des cellules eucaryotes

Nommées ainsi à cause de la présence d'un noyau contenant l'essentiel de leur matériel génétique, les cellules eucaryotes possèdent également une grande variété d'organites dont certains sont décrits Fig 1.4 (adaptée de [Kelvinsong, 2012]).

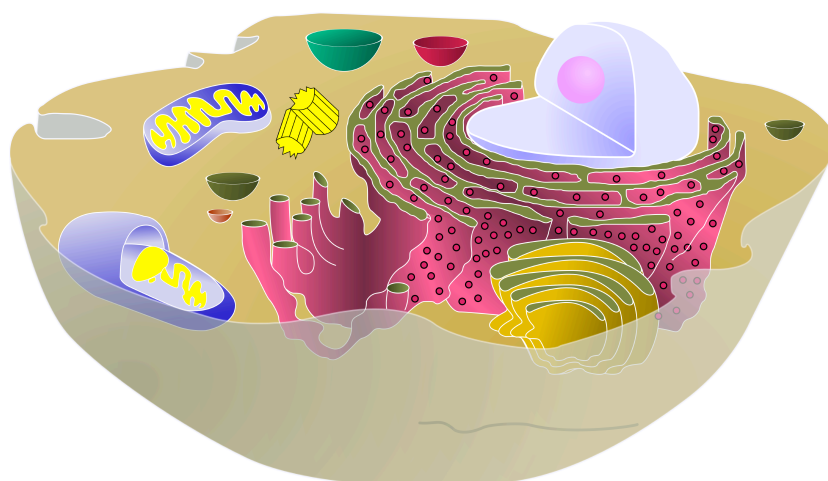


Figure 1.4 Représentation d'une cellule eucaryote en coupe. Le noyau est en blanc, relié au réticulum endoplasmique granuleux (en rose, les points rouges symbolisent les ribosomes). L'appareil de Golgi est en orange. Les mitochondries en bleu. La paire de centrioles en jaune. [Kelvinsong, 2012]

Toutes ces structures complexes sont compartimentées par des membranes au sein du cytoplasme, lui même délimité par la membrane plasmique (Fig 1.5, adaptée de [Hatfield, 2016]).

Ces membranes biologiques de près de 5 nm d'épaisseur sont composées d'un assemblage globalement fluide de deux couches de lipides où s'insèrent de multiples protéines qui participent pour 50% de la masse de la membrane en moyenne. Dans la cellule, ces lipides sont synthétisés en grande partie dans le

reticulum endoplasmique (en rose sur la Fig 1.4) avant d'être répartis dans l'ensemble des membranes de la cellule [van Meer, 2008].

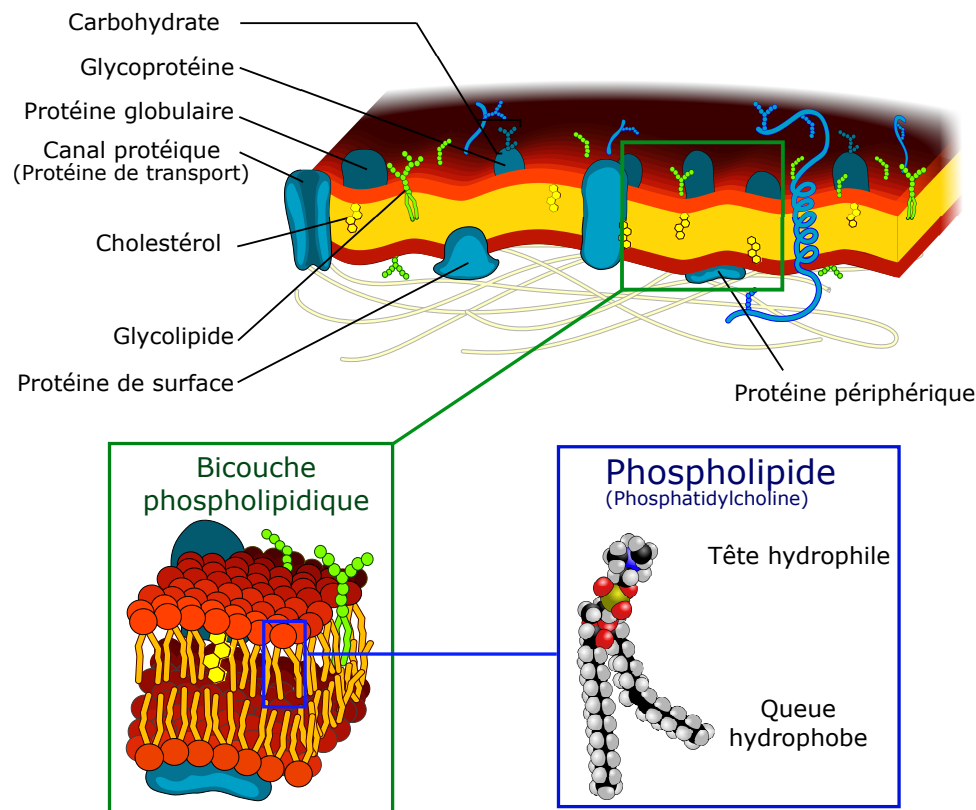


Figure 1.5 Schéma de la membrane plasmique. Les zooms successifs sur la bicouche d'environ 5 nm d'épaisseur mettent en évidence la structure « queue à queue » des lipides.

Les principaux lipides constitutifs de ces membranes sont les phospholipides, qui comprennent les glycérolipides et les sphingolipides (Fig 1.6 obtenue à partir de [Pankov, 2006 ; Calderón, 1997 ; Zinser, 1991]). Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une à plusieurs (le plus souvent deux) chaînes aliphatiques hydrophobes, la queue, associées généralement par une liaison ester à un groupement polaire hydrophile, la tête.

Membranes plasmiques	Glycérolipides	Sphingolipides	Cholestérol	Autre
Fibroblaste				
<i>Mus musculus</i> (NIH3T3)	74.8 %	12.2 %	13 %	-
Cellule de Schwann				
<i>Homo sapiens</i> (NF1T)	69.8 %	29.6 %	0.6 %	-
Levure				
<i>Saccharomyces cerivisiae</i>	99.8 %	-	-	0.2 %

Figure 1.6 Composition de plusieurs types de membranes biologiques en % molaire.
Compilation des données de [Pankov, 2006 ; Calderón, 1997 ; Zinser, 1991].

Le caractère amphipatique (amphiphile) et la forme de ces lipides leur permettent de s'associer par des liaisons faibles dans des solvants polaires (l'eau par exemple), en minimisant le contact des parties hydrophobes avec le solvant tout en maximisant les interactions entre parties hydrophiles. Un paramètre d'empilement de ces lipides, p , peut être calculé (Eq 1.1, tiré de [Israelachvili, 1976]), pour prédire la forme des structures formées par auto-assemblage.

$$p = V / A l \quad \text{Eq 1.1}$$

Avec V le volume occupée par le lipide, A l'aire projetée de la tête polaire, et l la longueur de la chaîne aliphatique. Les différentes structures obtenues en fonction de la valeur de p sont présentées Tab 1.1 (inspirée de [Israelachvili, 1976]).

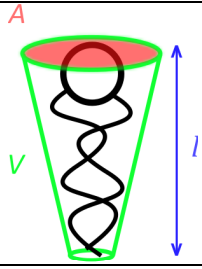
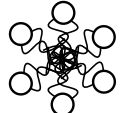
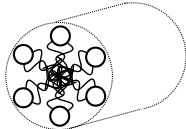
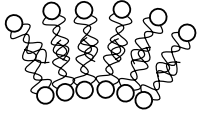
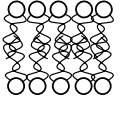
p	$p < 1/3$	$1/3 < p < 1/2$	$1/2 < p < 1$	$p = 1$	$p > 1$
	 Micelle sphérique	 Micelle cylindrique	 Bicouche, vésicule	 Bicouche plane	 Micelle inversée

Table 1.1 Auto-assemblages de lipides en fonction de leur paramètre d'empilement. Ici un seul type de lipide est représenté, mais un mélange complexe pourrait introduire des compensations ou des tris induits par la courbure. Les morphologies schématisées sont vues en coupe. [Israelachvili, 1976]

c) Changements de forme

On a ainsi décrit l'architecture de la membrane plasmique. D'un point de vue plus dynamique, le coefficient de diffusion d'un lipide au sein d'une couche [Saffman, 1975] est de l'ordre du $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, soit un temps caractéristique de l'ordre de quelques minutes pour une cellule typique (10-100 μm). Le temps caractéristique de basculement inter-couche, ou « flip-flop », est de l'ordre de quelques heures pour un système passif [Nakano, 2009], ce qui est assez lent. L'assemblage en bicouche reste toutefois globalement stable de par la structure chimique des lipides.

A l'échelle de la cellule, la membrane plasmique change de forme pour réaliser diverses fonctions biologiques. Pour une cellule se déplaçant sur une surface par reptation par exemple, on remarque sur sa région frontale des protubérances très actives (lamellipodes, filopodes) qui tendent à recouvrir le substrat en créant des points d'attache. A l'arrière, le contour de la cellule est

plus lisse [Blanchoin, 2014], la cellule se contractant pour se détacher du substrat et entraîner le noyau vers l'avant (Fig 1.7, tirée de [Alberts, 2002]). La mobilité cellulaire s'accompagne ainsi dans ce cas d'un changement de forme important.

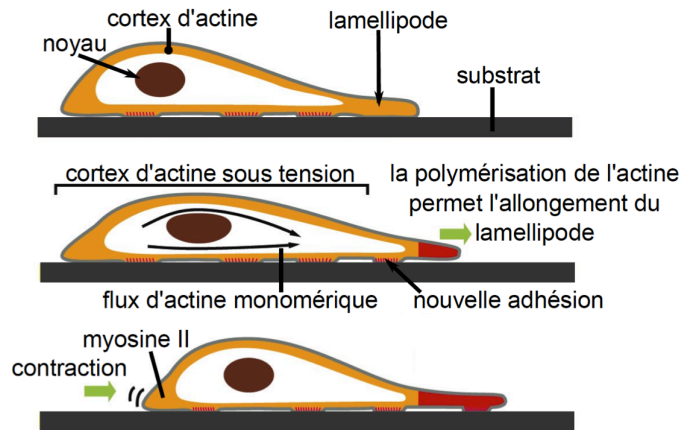


Figure 1.7 Modèle du mouvement cellulaire sur un substrat, décomposé en trois étapes. De haut en bas : une structure très plane très fine de 200 nm d'épaisseur se forme à l'avant. En parallèle de cet étalement, de nouveaux ancrages servent de points d'appuis au mouvement cellulaire. Enfin, l'arrière de la cellule se contracte pour détacher le corps cellulaire du substrat. [Alberts, 2002]

Dans une cellule mère en division, la membrane est de nouveau très sollicitée, puisqu'elle doit elle-même se scinder en deux afin de donner naissance à deux cellules filles. La division cellulaire est un processus lent chez les eucaryotes (1h30 pour les levures, 16 à 24 heures pour des fibroblastes humains), qui déforme considérablement la membrane plasmique. La Fig 1.8 (tirée de [Krish, 2013]) illustre cette déformation dans le cadre particulier de cellules végétales en mitose. On observe en particulier la création d'une paroi cellulaire (en rouge) entre les cellules filles dont on ne distingue que le noyau (en vert). C'est une preuve indirecte que la membrane plasmique a été coupée en deux.

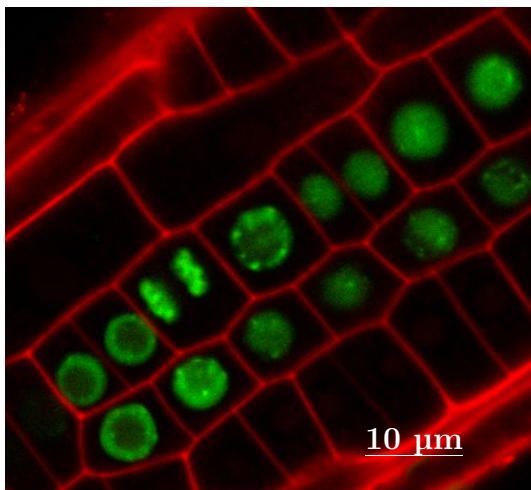


Figure 1.8 Cellules de l'épiderme d'une racine d'Arabidopsis. Noyaux marqués grâce à H2B-YFP attaché à l'histone. Parois cellulaires colorées à l'iodure de propidium. L'apparition progressive d'une paroi cellulaire entre les deux cellules filles au cours d'une division cellulaire suggère une déformation radicale de la membrane plasmique de la cellule mère. [Krish, 2013]

Ces changements de forme résultants de différents mécanismes intracellulaires peuvent être induits et/ou modifiés par l'environnement cellulaire. En effet, la polarité et l'axe de divisions de cellules isolées en culture peuvent par exemple être déterminés en choisissant l'organisation de la matrice extracellulaire [Thery, 2006]. A l'échelle d'un tissu, le couplage mécanique entre cellules conduit à une coordination des comportements individuels et même à la modification de l'expression des gènes de ces cellules [Heisenberg, 2013].

Ayant abordé le changement de forme cellulaire dû à diverses fonctions biologiques, on peut se poser la question de l'origine de ces déformations. Quelles forces sont susceptibles de déformer une membrane biologique, et de quelles manières ?

2) Un système biomimétique : le liposome

Afin de pouvoir décrire le comportement des membranes biologiques introduites ci-dessus sans se perdre dans la complexité et la variété des interactions lipidiques possibles, une étape, avant la mise en place d'un système plus physiologique, consiste à utiliser des membranes simplifiées. D'abord, je vais décrire comment créer expérimentalement ce type de membrane, puis on s'attachera aux descriptions de la physique de ces objets, et qui ont permis des mesures de caractérisation mécanique.

a) Le liposome

Afin de recréer une membrane plasmique en bicouche de lipides, on peut se référer à la Tab 1.1 et choisir des lipides avec un paramètre d'empilement vérifiant $1/2 < p < 1$, pour qu'ils s'auto-organisent en bicouche. Les mélanges de lipides couramment utilisés sont à base de sphingolipides et de glycérolipides dont on peut citer le DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [Attwood, 2013] ou l'EPC (L- α -phosphatidylcholine) [Senior, 1982]. On peut y ajouter des lipides fluorescents pour faciliter l'observation (Bodipy-FL-C5 [Semova, 2012], Texas Red DHPE [Shih, 2011]), du cholestérol pour rigidifier le plus souvent la structure, des lipides pouvant donner lieu à des interactions avec une protéine chimère (NTA-Ni pour se lier à l'histidine, PEG-biotine pour se lier à la streptavidine) ou tout autre mélange extrait de la cellule. Les vésicules fabriquées avec cette composition, unilamellaires (une seule bicouche lipidique) et d'un diamètre compris entre 1 et 100 μm seront appelées par la suite liposomes. Ce terme est l'équivalent du terme anglais « GUV » (Giant Unilamellar Vesicle) [Wesołowska, 2009].

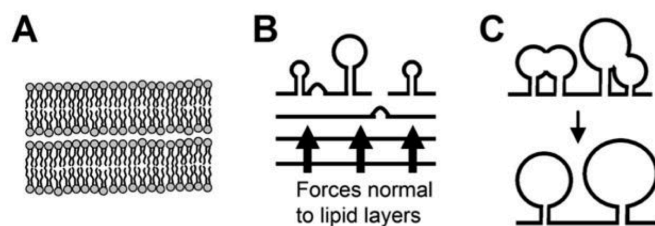


Figure 1.9 Schéma des étapes de formation d'un liposome. A auto-organisation des lipides en bicouches successives. B Grossissement des liposomes favorisé par des forces normales aux bicouches. C Fusion des liposomes adjacents. [Horger, 2009]

sur la méthode décrite Fig 1.9 (tirée de [Horger, 2009]). Il y a successivement : une étape d'hydratation des lipides pour induire leur auto-organisation, le gonflement de ces bicouches [Weinberger, 2013] que l'on peut par exemple favoriser par injection de solution [Karamdad, 2015], puis la fusion des structures proches par coalescence. On peut ainsi créer des liposomes à l'aide de techniques de micro-fluidique, par exemple en injectant une solution aqueuse à travers un film de lipides, par hydratation d'un gel, ou encore par émulsion inverse en faisant traverser une micelle inversée à travers une monocouche de lipides [Pautot, 2003]. Je vais toutefois décrire un peu plus longuement la technique que j'ai utilisée tout au long de ma thèse : l'électroformation.

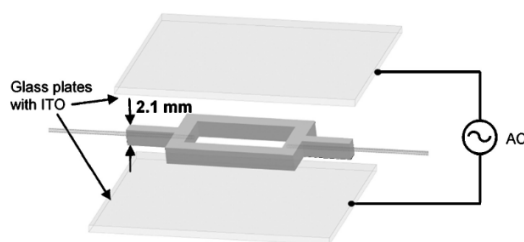


Figure 1.10 Schéma d'une chambre d'électroformation. Ici un flux permet de collecter les liposomes formés par le passage du courant à travers les plaques d'ITO (Indium Tin Oxyde), et les parois de la chambre ne sont pas en Vitrex mais en PDMS (PolyDiMethylSiloxane). [Estes, 2005]

Cette méthode a été mise au point en 1986 par Angelova [Angelova, 1986], et elle est couramment utilisée au laboratoire, en particulier dans l'équipe de Patricia Bassereau. Un dépôt de lipides déshydratés est placé sur des lames de verre recouvertes d'un revêtement conducteur d'ITO (Indium Tin Oxyde), espacées de quelques millimètres, pour créer une chambre d'électroformation comme sur la Fig 1.10 tirée de [Estes, 2005]. Une solution dite intérieure, non ionique (< 50 mOsm, à moins d'introduire un flux dans la chambre pour détacher les liposomes formés comme [Estes, 2005]), peut alors réhydrater le dépôt de lipides. Le passage d'un courant alternatif (10 Hz à $2.3 V_{\text{pic-à-pic}}$ pour mes propres expériences) de part en part de la chambre aboutit en quelques heures à la formation de liposomes contenant la solution de réhydratation

utilisée. Ces liposomes, dont la composition intérieure est alors fixée, peuvent être placés dans un milieu différent par dilution. On appelle alors ‘solution extérieure’ ce nouvel environnement. Mon propre protocole détaillé est décrit en annexe B.

La taille des vésicules obtenues peut être diminuée en vortexant ou en extrudant la solution. Les GUVs deviennent alors des LUVs (Large Unilamellar Vesicle) ou même des SUVs (Small Unilamellar Vesicle). On ne peut toutefois pas facilement encapsuler de protéines par cette technique d’électroformation [Garten, 2015], celles-ci étant sensibles à la fois à la présence du champ électrique, et aussi au manque de sel. Il faudrait alors se servir de la technique d’émulsion inverse [Pautot, 2003], au rendement beaucoup plus faible.

b) Membranes modèles

Maintenant que l’on a décrit comment créer des objets (liposomes) mimant la membrane plasmique d’une cellule eucaryote, intéressons-nous à l’étude de leurs propriétés physiques. C’est au début des années 1970 que Canham [Canham, 1970], Helfrich [Helfrich, 1973], et Evans [Evans, 1973] posèrent les bases de la théorie des membranes lipidiques, en énonçant les trois types de déformations possibles de ces membranes (Fig 1.11 adaptée de [Canham, 1970]), et en leur associant une densité surfacique d’énergie.

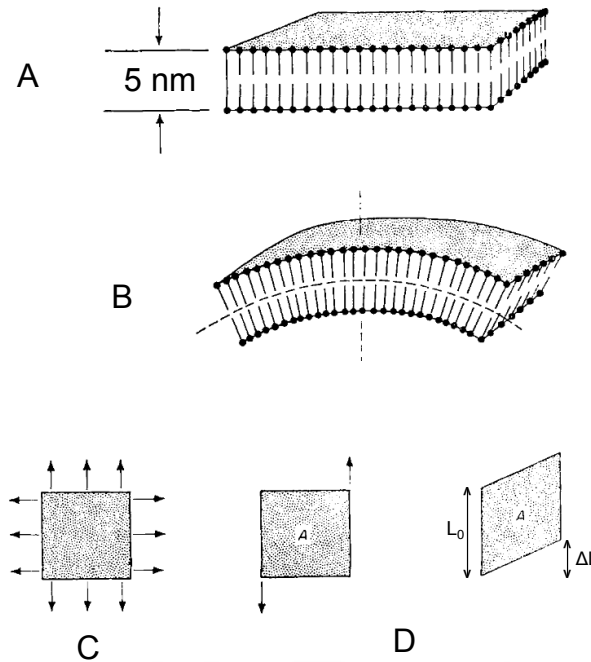


Figure 1.11 Modes de déformation d'une membrane. A Représentation d'une membrane plane. **B** Courbure **C** Extension/compression **D** Cisaillement. [Canham, 1970]

Courbure :

Ce sont toutes les déformations non incluses dans le plan de la membrane (Fig 1.11.B). Géométriquement, on peut associer à cette déformation la densité d'énergie de courbure H_{courb} :

$$H_{courb} = \frac{1}{2} \kappa (C - C_0)^2 + \kappa_g C \quad Eq\ 1.2$$

Où κ est le module de courbure, C la courbure moyenne de la membrane définie comme la somme de l'inverse de ses deux rayons de courbures principaux, C_0 la courbure spontanée c'est-à-dire la courbure obtenue sans contraintes mécaniques ($C_0 = 0$ pour une membrane plane), et κ_g le module de courbure gaussienne. Le module de courbure représente l'énergie nécessaire à courber la membrane. Le module de courbure gaussienne n'intervient que pour des déformations impliquant un changement topologique de la membrane. Comme dans nos expériences on gardera le liposome homéomorphe à une sphère (sans trou), le dernier terme de l'Eq 1.2 restera constant. On définira donc l'énergie totale de la membrane sans ce terme, étant donné que nous souhaitons calculer des variations d'énergie.

Extension/compression :

Lorsqu'il y a variation d'aire ΔA pour une membrane d'aire A (Fig 1.11.C), on associe la densité d'énergie surfacique H_{ext} :

$$H_{ext} = \frac{1}{2} \chi \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad Eq\ 1.3$$

Avec χ le module d'extension, de l'ordre de 0.2 J/m² [Rawicz, 2000]. Cette variation d'aire ne peut dépasser 8 % [Roux, 2004] sans endommager la membrane en ouvrant des pores. Appliquée à un liposome, cela conduit à son éclatement.

Cisaillement :

Il se produit lorsque la membrane est déformée sans changement d'aire, sur deux directions parallèles et opposées (Fig 1.11.D). La densité d'énergie H_{cis} associée est donnée par la loi de Hooke :

$$H_{cis} = \frac{1}{2} \mu (\lambda^2 - 2 + \lambda^{-2}) \quad Eq\ 1.4$$

Où λ représente le taux de déformation latérale $((L_0 + \Delta L)/L)$ et μ le module de cisaillement. Dans le cas des membranes fluides, du fait de la diffusion rapide des lipides au sein d'une couche, les membranes n'opposent aucune résistance élastique au cisaillement, et on prendra $\mu = 0$ pour la suite.

Finalement, on peut écrire la densité d'énergie élastique totale H liée à l'ensemble des déformations d'une membrane lipidique :

$$H = H_{courb} + H_{ext} = \frac{1}{2} \chi \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 + \frac{1}{2} \kappa (C - C_0)^2 \quad Eq 1.5$$

On appellera par la suite modèle d'Helfrich [Helfrich, 1984] le raisonnement aboutissant à l'hamiltonien de l'Eq 1.5.

c) Mesures des propriétés des membranes

Les preuves expérimentales de ce modèle ont été apportées un peu plus tard, en étudiant la déformation des contours d'un liposome fluctuant à l'aide d'une micropipette [Evans, 1990], ou sans [Méléard, 1998]. En aspirant un liposome à l'aide d'une micropipette, on peut en effet faire varier la pression d'aspiration tout en mesurant les variations de surface d'un liposome (Fig 1.12 tirée de [Rawicz, 2000]).

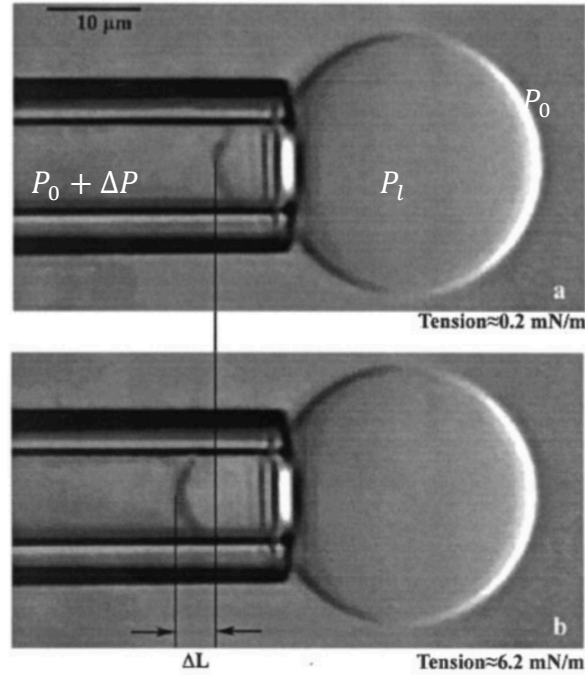


Figure 1.12 Aspiration d'un liposome par une micropipette. L'augmentation de la pression d'aspiration entre **a** et **b** crée une augmentation de la taille de la langue dans la micropipette. [Rawicz, 2000]

La partie du liposome aspirée, la « langue », épouse la surface intérieure de la micropipette sans adhérer au verre. La pression d'aspiration de cette dernière est ajustée en la reliant à un réservoir d'eau (de masse volumique ϱ) de hauteur h variable, $h = 0$ étant déterminé expérimentalement pour une absence de flux en sortie de la micropipette. On peut alors appliquer la loi fondamentale de l'hydrostatique pour connaître la pression d'aspiration ΔP de la micropipette par rapport à la pression extérieure du liposome P_0 avec g l'accélération de pesanteur :

$$\Delta P = \varrho g h \quad \text{Eq 1.6}$$

En appliquant la loi de Laplace au liposome de pression P_l , de rayon r_l , maintenu dans la micropipette de rayon r_m , en deux endroits de courbure connue (Eq 1.7), on peut alors accéder à la tension de membrane σ du liposome (Eq 1.8) :

$$P_l - P_0 = \frac{2 \sigma}{r_l} ; P_l - P_0 + \Delta P = \frac{2 \sigma}{r_m} \quad \text{Eq 1.7}$$

$$\sigma = \frac{r_m}{2 (1 - r_m/r_l)} \Delta P \quad \text{Eq 1.8}$$

A partir du modèle d'Helfrich (Eq 1.5), il est possible de calculer l'amplitude maximale des fluctuations d'une membrane sous tension [Helfrich, 1984, 1985], en faisant appel au théorème d'équipartition de l'énergie. On peut alors relier la tension de la membrane à ses déformations :

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{k_B T}{8 \pi \kappa} \ln \left(\frac{\kappa \pi^2}{\sigma a^2} \right) + \frac{\sigma}{\chi} \quad \text{Eq 1.9}$$

Où a est la taille moléculaire (soit la taille minimale des fluctuations), k_B la constante de Boltzmann, et T la température. Cette formule a l'avantage d'être vérifiable expérimentalement en traçant la courbe tension σ en fonction de l'excès d'aire $\Delta A/A$ pour différentes valeurs d'aspiration de la micropipette (Fig 1.13, tirée de [Rawicz, 2000]).

On peut alors distinguer deux régimes. A haute tension, il y a simple proportionnalité entre excès d'aire et tension (le second terme de l'addition de l'Eq 1.9 domine) c'est donc un régime enthalpique, sur lequel on peut mesurer χ , la membrane étant purement élastique. A basse tension, c'est le terme en

$\ln(\dots)$ qui domine : il s'agit du régime entropique représentant les fluctuations de la membrane.

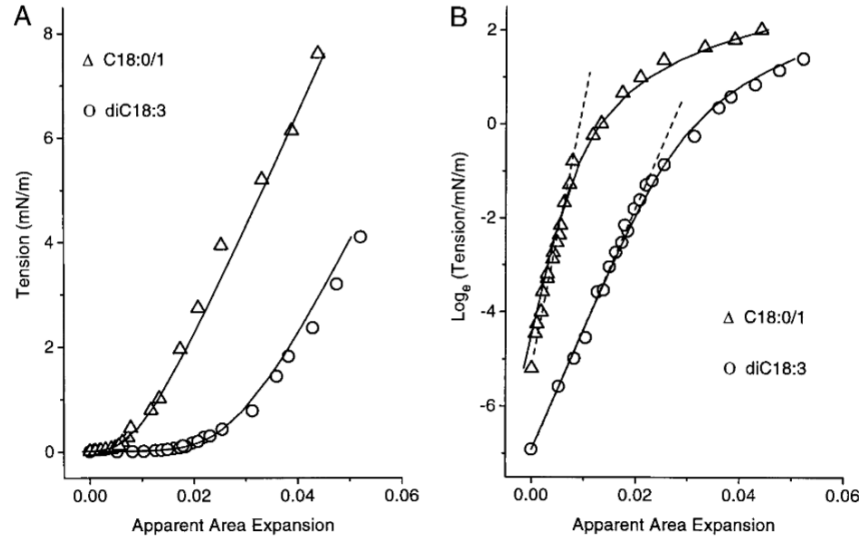


Figure 1.13 Courbes tension/excès d'aire pour deux types de liposomes de compositions lipidiques différentes. A Régime enthalpique permettant le calcul des modules de compressibilité ($\chi_C = \chi_{dic} = 230 \text{ mN/m}$). B Régime entropique permettant le calcul des modules de courbure ($\kappa_C = 22.5 k_B T$, $\kappa_{dic} = 10 k_B T$). [Rawicz, 2000]

En ajustant les données expérimentales, on peut alors directement obtenir les deux paramètres importants, κ (de l'ordre de la dizaine de $k_B T$, ce qui soumet donc la membrane des liposomes aux fluctuations thermiques) et χ (de l'ordre de la centaine de mN.m^{-1}), qui peuvent varier en fonction des compositions lipidiques et des solutions utilisées, ainsi que du mode de fabrication des liposomes.

A partir du modèle d'Helfrich et de ses développements expérimentaux, on a désormais les outils pour comprendre les principales caractéristiques du comportement d'une membrane biologique. On peut ainsi essayer de savoir si la membrane plasmique a la capacité à elle seule, de rendre compte des formes cellulaires décrites plus tôt (I.1.c).

d) Déformation passive d'une membrane modèle

Pour rendre compte de toutes les formes possibles prises par les liposomes à basse tension, l'Eq 1.10 montrant qu'il y avait de moins en moins de changement de forme de la membrane en augmentant la tension, il faut intégrer des éléments microscopiques nouveaux par rapport à la description d'Helfrich (Eq 1.5). D'une part la membrane plasmique est constituée de deux couches de lipides, d'autre part les aires de ces deux couches ne sont pas forcément égales. Ce nouveau modèle (ou description ADE pour Area-

Difference-Elasticity [Miao, 1994]) permet de déterminer la forme d'une vésicule d'aire A à partir de trois paramètres dont le plus important concerne le volume réduit d'un liposome. Ce paramètre est facilement modifiable dans les expériences. Originellement, on a par exemple augmenté la température [Käs, 1991], ce qui donne lieu à des transitions de forme ainsi qu'à des instabilités. Ainsi de véritables diagrammes de phases peuvent être obtenus et soutenus par des modèles théoriques [Lipowski, 1998 ; Jarić, 1995].

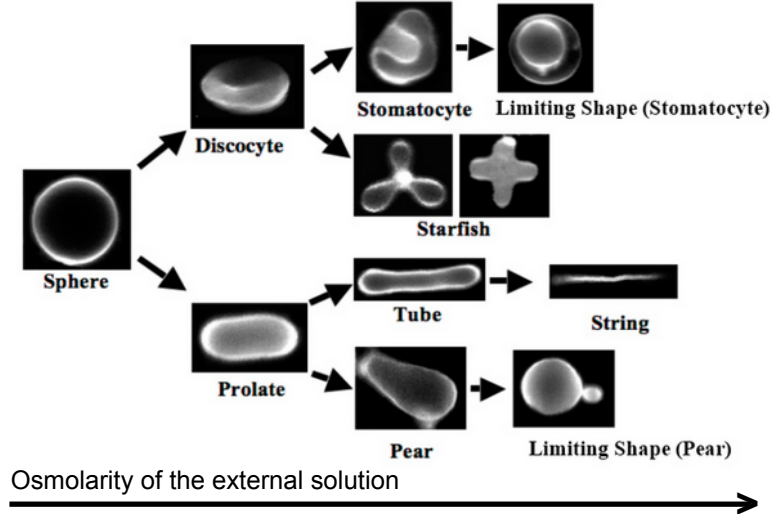


Figure 1.14 Suivi de la forme d'un liposome composé d'un mélange ternaire de lipide, lors de l'augmentation de l'osmolarité de la solution extérieure par ajout de soluté. Cela revient à diminuer v en allant de la gauche vers la droite de ces images. [Yanagisawa, 2008]

On peut définir un volume réduit v , comme le rapport du volume du liposome V sur le volume d'une sphère de même aire A . On obtient alors un nombre sans dimension compris entre 0 et 1, vu que la sphère est l'objet qui emprisonne le plus grand volume pour une aire donnée.

$$v = \frac{V}{\left(\frac{4}{3}\pi\right) \left(\frac{A}{4\pi}\right)^{3/2}} \quad \text{Eq 1.10}$$

En effet, lorsque les liposomes sont électroformés, ceux-ci possèdent un nombre de lipides fixé, ce qui impose que leur aire surfacique A soit constante. La bicouche de lipides étant perméable à l'eau [Huster, 1997 ; Koenig, 1992], mais imperméable aux ions ou aux protéines, l'équilibre des pressions osmotiques de part et d'autre peut alors modifier ce volume réduit, et ainsi modifier la forme des liposomes comme le montre la Fig 1.14 (tirée de [Yanagisawa, 2008]). Dans cette expérience, seule la modification de l'osmolarité de la solution extérieure permet d'aboutir aux déformations du liposome ce qui donne ces bifurcations.

Le fait que la membrane seule puisse se déformer en fonction des fluctuations thermiques ou de changement d'osmolarité ne suffit cependant pas à expliquer la persistance de certaines formes cellulaires ou le mouvement dirigé de reptation mis en évidence au I.1.c. Il faut donc chercher dans la cellule eucaryote une structure capable de déformer la membrane plasmique et de maintenir la forme cellulaire : le cytosquelette.

3) Une structure cellulaire organisée : le cytosquelette

Le cytosquelette d'une cellule n'est pas tout à fait à la cellule ce que le squelette (au sens des vertébrés) est à l'homme. Ce terme désigne en effet l'ensemble organisé des polymères biologiques qui permettent à la cellule de se mouvoir (propriétés mécaniques) et de maintenir sa forme (propriétés architecturales). Pour reprendre l'analogie avec les vertébrés, il faudrait donc inclure également les muscles pour prendre en compte cette dynamique, tout en imaginant des 'os polymères', aux longueurs variables au cours du temps. Les filaments qui forment le cytosquelette sont constitués de trois types : les microtubules, les filaments d'actine, et les filaments intermédiaires (Fig 1.15 tirée de [Alberts, 2002]). Comme les filaments d'actine sont *in vivo* principalement concentrés au niveau de la membrane plasmique, et donc susceptibles de modifier la forme de celle-ci, je me limiterai à l'étude du cytosquelette d'actine. Après avoir présenté la molécule d'actine, on détaillera la dynamique de polymérisation *in vitro*, ainsi que les protéines associées dont je me suis servi pour mes expériences.

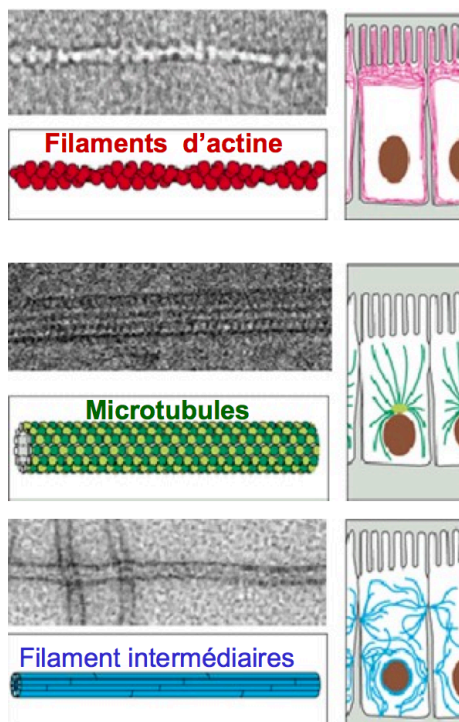


Figure 1.15 Réseaux de filaments constituant le cytosquelette. A gauche, en haut : filaments d'actine, image en microscopie électronique. Le diamètre de ce double brin de protéines est de 6-7 nm. Au milieu : tube creux rigide de 25 nm de diamètre composé de tubuline (13 protofilaments) vue en microscopie électronique. En bas : filaments intermédiaires, constitués de protéines hétérogènes de 7 à 11 nm de diamètre, vue en microscopie électronique. A droite schéma de localisation de chacun de ces éléments dans une cellule eucaryote. [Alberts, 2002]

a) L'actine

L'actine est une protéine ubiquitaire, c'est-à-dire qu'on peut la retrouver dans tous les types cellulaires. Isolée pour la première fois à partir de cellules musculaires, le biochimiste Ferenc Bruno Straub établit l'existence de l'actine sous deux formes différenciées [F.B. Straub, 1943] : l'actine-G ou globulaire est constituée de monomères isolés de 5.5 nm de diamètre, et l'actine-F ou filamenteuse est un polymère pouvant former des structures dynamiques complexes de taille cellulaire.

Actine-G

Sous sa forme globulaire représentée Fig 1.16 tirée de [Splettstoesser, 2006], l'actine est une protéine issue de l'enchaînement de 375 acides aminés [Kabsch, 1990], créant deux parties séparées par une cavité, qui peut accueillir un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), ainsi qu'une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou d'ADP (Adénosine DiPhosphate). Chaque lobe peut être dissocié en deux sous-domaines : l'ensemble I et III forment le bout barbé noté (+), l'ensemble II et IV forment le bout pointu noté (-).

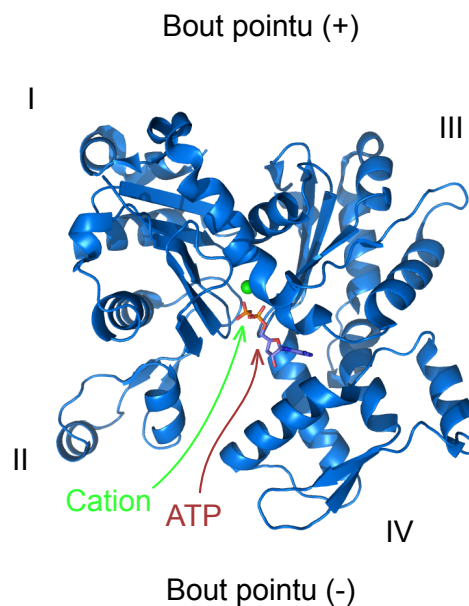


Figure 1.16 Structure d'un monomère d'actine complexé avec un cation divalent (en vert) et une molécule d'ATP (en rouge). [Splettstoesser, 2006]

Actine-F

C'est un polymère formé d'une chaîne linéaire de monomères d'actine où chacun est en contact avec quatre autres. Cet assemblage peut être vu comme l'enroulement de deux protofilaments formant une hélice dont le pas est de 37

nm (Fig 1.17 adaptée de [Oda, 2009]). Les monomères s'assemblant toujours de la même manière (bout (+) avec bout (-)), la polymérisation engendre un filament polaire dont l'orientation globale est identique à celle de chacun de ses éléments. Mécaniquement, l'actine-F est modélisée par un polymère semi-flexible auquel on peut associer une longueur de persistance de l'ordre de 10 μm . En dessous de cette longueur, le filament se comporte comme un matériau rigide, au delà, il est en mesure de se courber.

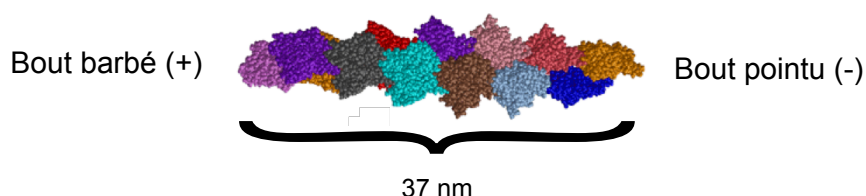


Figure 1.17 Structure d'un filament d'actine. On remarque que chaque monomère s'insère avec la même orientation dans le filament. [Oda, 2009]

On a décrit les deux formes sous lesquelles l'actine a pu être observée *in vivo*, mais il faut ajouter à cette description statique la dynamique d'assemblage des monomères d'actine, qui est propre à chacun des deux bouts (+ et -) du filament d'actine.

b) Dynamique de polymérisation *in vitro*

La polymérisation de l'actine a pu être reproduite *in vitro* afin d'en caractériser les différentes étapes ainsi que leurs constantes de vitesses associées, d'abord en l'absence des autres protéines présentes dans une cellule.

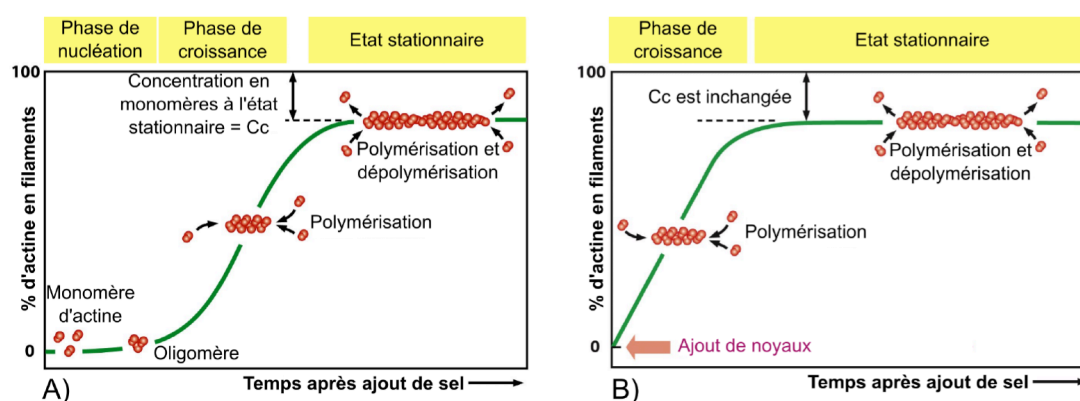


Figure 1.18 Suivi de la polymérisation d'actine en fonction du temps. La polymérisation est déclenchée par l'ajout de sel **A)** à partir de monomères purs d'actine-G, **B)** à partir de noyaux (association de trois monomères). [Alberts, 2002]

On peut en effet suivre de la dynamique de polymérisation par spectroscopie de fluorescence, en se basant sur le fait que le marquage de

monomères d'actine par le pyrène est d'autant plus fluorescent que les monomères sont proches (les cycles des pyrènes se superposant par interactions $\pi - \pi$). Un tel suivi met en évidence trois phases distinctes (Fig 1.18.A-B, d'après [Alberts, 2002]) : la phase de nucléation, d'élongation et l'état stationnaire.

Nucléation

C'est l'étape cinétiquement déterminante. Pour créer un début de filament, il faut d'abord qu'il y ait association de trois monomères isolés pour former un oligomère appelé 'noyau'. Ce retard à la polymérisation peut être supprimé si on ajoute des noyaux (ou des oligomères) dès le début (Fig 1.20.B).

Elongation

Après l'apparition de noyaux, les filaments vont croître par addition de monomères à chacune de leurs extrémités. Du fait de la polarisation du filament, les constantes cinétiques d'addition k_{on} et de suppression k_{off} d'un monomère d'actine, de concentration C en solution, ne sont pas identiques aux deux bouts. Les taux de croissance nets au bout barbé (+) τ_+ et au bout pointu (-) τ_- s'écrivent alors :

$$\begin{cases} \tau_+ = k_{on}^+ C - k_{off}^+ \\ \tau_- = k_{on}^- C - k_{off}^- \end{cases} \quad Eq\ 1.11$$

Ce système fait apparaître deux concentrations critiques pour l'actine-G, correspondant à des taux de croissance nuls : $C_+^* = k_{off}^+ / k_{on}^+$ et $C_-^* = k_{off}^- / k_{on}^-$. Ces concentrations critiques sont dépendantes du bout considéré, mais également de l'état ATP ou ADP de l'actine [Pollard, 1986]. Elles ont pu être mesurées par titration en fluorimétrie, en présence d'ATP, à $C_-^* = 0.6 \mu M$ et $C_+^* = 0.12 \mu M$. Les différents cas de figure en fonction de la concentration de départ en actine-G C_0 sont représentés Tab 1.2.

	$C_0 < C_+^*$	$C_+^* < C_0 < C_-^*$	$C_-^* < C_0$
Bout barbé (+)	décroissance	croissance	croissance
Bout pointu (-)	décroissance	décroissance	croissance

Table 1.2 Etude de la longueur d'un filament d'actine à ses deux extrémités en fonction de la concentration d'actine-G en solution.

A mesure que le filament s'allonge, l'actine-G devenant de l'actine-F, la concentration en monomères isolés va diminuer ce qui revient à parcourir la Tab 1.2 de droite à gauche.

Phase stationnaire

En présence d'ATP, et en prenant en compte l'hydrolyse de l'ATP en ADP, le système de l'Eq 1.11 va se rapprocher du moment où cinétique d'assemblage (au bout barbé) et cinétique de désassemblage (au bout pointu) se compensent. La taille du filament obtenu est alors constante, mais la différence d'activité aux bouts (+) (addition de nouveaux monomères) et (-) (soustraction de l'actine-ADP), engendre un effet dit de 'tapis roulant'.

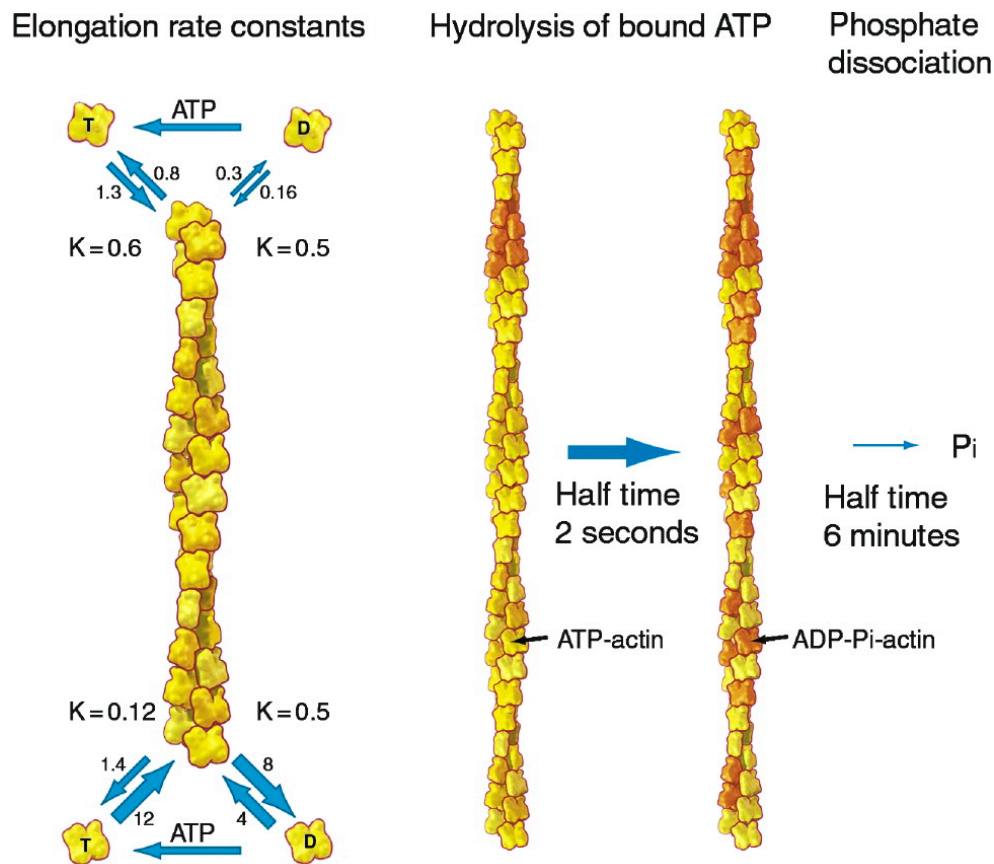


Figure 1.19 Dynamique d'association des monomères d'actine-G au filament (à gauche) et au sein d'un filament (à droite). A gauche sont indiqués les taux d'association (en $\mu M^{-1}s^{-1}$), de dissociation (en s^{-1}) et leurs rapports représentant la constante d'équilibre K (ou la concentration critique). A droite on observe dans un premier temps l'hydrolyse de l'ATP lié à l'actine en ADP- P_i , l'actine jouant ici le rôle d'ATPase. Le phosphate reste piégé dans la cavité avec l'ADP, au sein du monomère d'actine avant de se détacher au bout d'un temps relativement long (6 minutes en moyenne). [Pollard, 2003]

Il a effectivement été montré que si l'on suit la position d'un monomère d'actine dans un filament, il s'incorpore au bout (+) sous la forme ATP, migre vers le bout (-) tandis que l'ATP s'hydrolyse, puis se sépare du filament sous la

forme ADP [Fujiwara, 2002]. L'ensemble de ces dynamiques est résumé Fig 1.19, tirée de [Pollard, 2003].

Cependant, lorsque l'on s'intéresse à la dynamique de l'état stationnaire, la vitesse du 'tapis roulant' est de seulement $0.04 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$, soit deux ordres de grandeur en dessous des vitesses que peut atteindre une cellule en mouvement comme le kératocyte ($10 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$). La dynamique de polymérisation ne peut donc pas à elle seule expliciter les comportements cellulaires observés. De plus les structures générées sont loin d'être de simples filaments comme on peut l'observer dans un lamellipode (I.4). En réalité, l'actine interagit dans la cellule avec un grand nombre de partenaires.

c) Protéines de régulation

Pour comprendre les comportements du cytosquelette d'actine *in vivo*, il faut donc faire intervenir des protéines capables de se lier à l'actine ou ABP (Actin-Binding-Protein). Celles-ci jouent un rôle essentiel dans la dynamique de polymérisation d'actine en étant à même de se lier directement aux filaments ou aux monomères d'actine, d'influencer la stabilité, la dépolymérisation, la réticulation, la nucléation, la formation des réseaux, soit des fonctions toutes essentielles au bon fonctionnement d'une cellule [Dos Remedios, 2003]. Comme on dénombre aujourd'hui plus d'une centaine d'ABP, nous n'illustrerons ici que quelques exemples.

Les ligands de l'actine-G

La concentration en actine-G au sein du cytosol est, pour la plupart des cellules, aux alentours de $300 \mu\text{M}$ ce qui est bien au-delà des concentrations critiques ($C_-^* = 0.6 \mu\text{M}$ et $C_+^* = 0.12 \mu\text{M}$) déterminées précédemment *in vivo*. Cette énorme différence s'explique par la présence de protéines en mesure de séquestrer l'actine-G tout en la rendant disponible en cas de besoin.

La Profiline

D'un poids moléculaire compris entre 14 et 15 kDa, cette protéine découverte en 1977 [Carlsson, 1977] se lie préférentiellement aux monomères actine-ADP et favorise l'échange du nucléotide pour reformer six fois plus rapidement un monomère actine-ATP [Theriot, 1994]. Elle peut former un complexe avec l'actine en s'attachant au bout barbé, ce qui force la polymérisation par addition des monomères sur le bout barbé (+) des filaments. Cet ajout au filament suscite un changement de conformation de la profiline qui

favorise sa dissociation du filament, rendant le bout (+) de nouveau disponible. En l'absence de protéines dites de coiffe (que l'on présentera ci-après), la profiline favorise donc la croissance dirigée des filaments par leur bout (+). En leur présence, par contre, la profiline est réduite au rôle de séquestration des monomères d'actine, ce qui empêche tout de même la formation d'oligomères en solution et donc toute nucléation spontanée.

La thymosine β_4

Cette petite protéine séquestrante (43 acides aminés), très abondante chez les animaux, puisque sa concentration *in vivo* atteint 0.5 mM [Hannappel, 2007], est capable de se lier à l'actine-G avec une stœchiométrie un pour un. Elle empêche la nucléation, la polymérisation de l'actine, ainsi que l'échange du nucléotide ou l'hydrolyse d'actine-ATP, son affinité pour l'actine-ATP ayant été mesurée à plus de cinquante fois supérieure à celle pour l'actine-ADP [Carlier, 1993].

Les protéines nucléatrices de l'actine

A cause de la présence des protéines séquestrantes, la production spontanée de filaments d'actine est rendue quasiment impossible. Il faut donc que la cellule fasse intervenir des protéines à même d'amorcer des filaments, ce sont les nucléateurs. Eux-mêmes sont recrutés par des protéines promouvant la nucléation (Nucleator Promoting Factor - NPF) dont on verra un exemple.

Le complexe Arp2/3

Premier nucléateur de l'actine identifié [Miller, 1989], on le retrouve dans de nombreux organismes vivants. C'est en effet une protéine qui a peu changé au cours de l'évolution, de la levure aux mammifères.

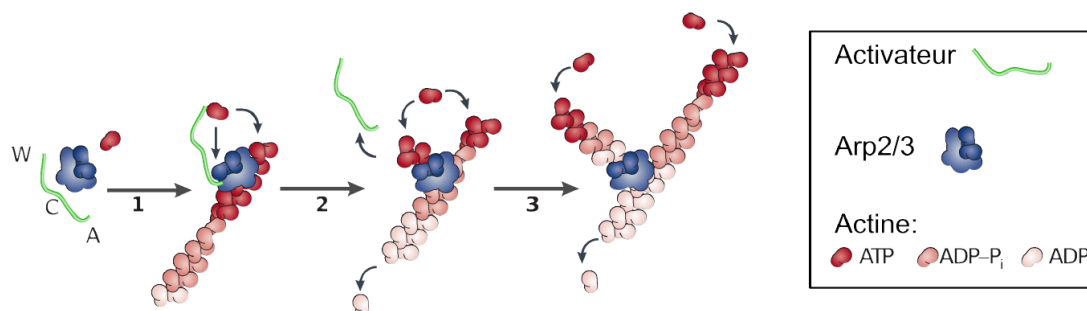


Figure 1.20 Modèle d'activation et de nucléation du complexe Arp2/3. La présence de l'activateur du complexe lui permet de changer de conformation, ce qui le rend en mesure de se lier à un filament d'actine. Un nouveau filament 'branché' peut alors croître alors que l'activateur se dissocie. [Goley, 2006]

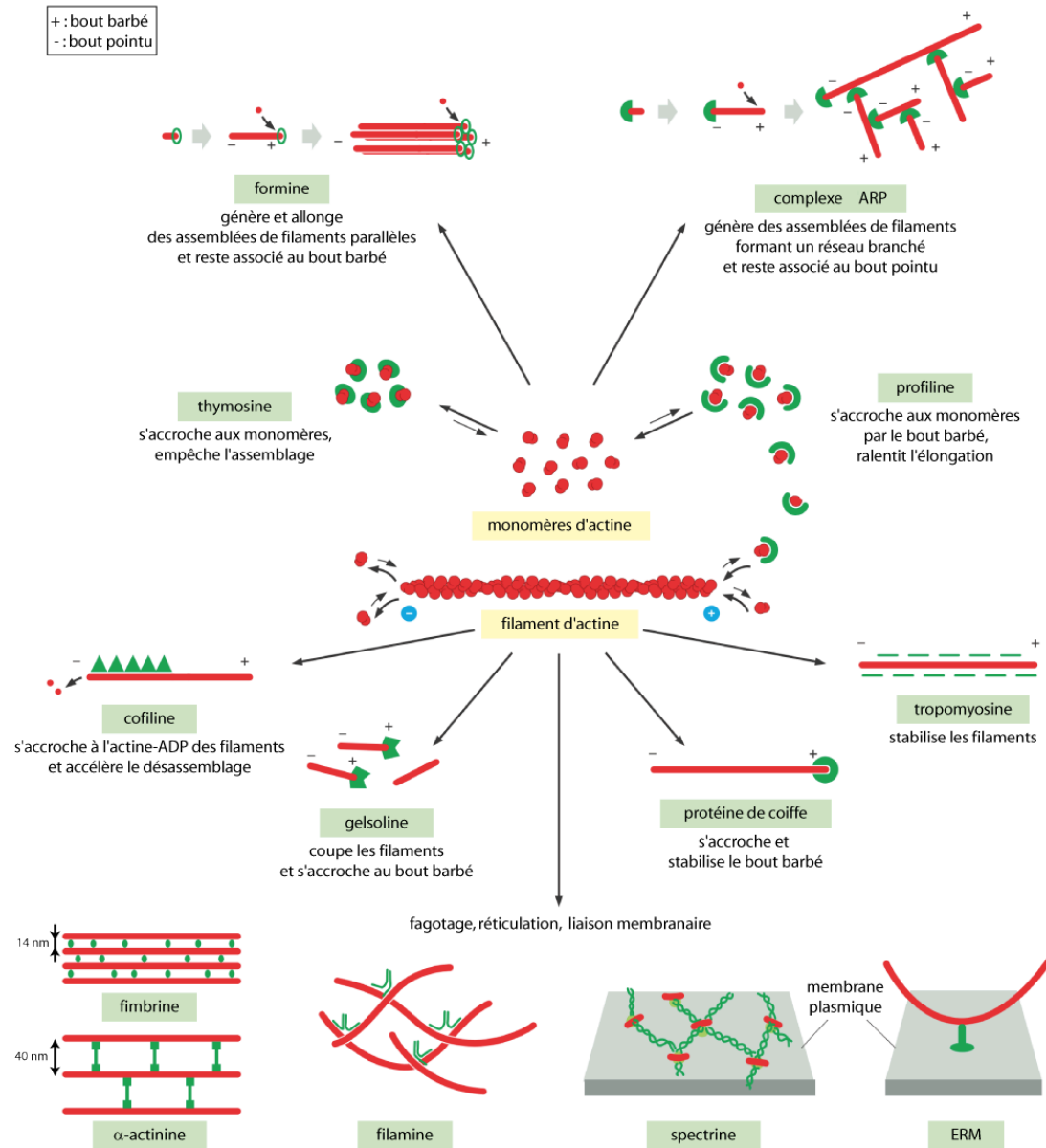


Figure 1.23 Schéma de différentes protéines capables de se lier à l'actine (ABP - Actin Binding Protein), et de réguler sa polymérisation. L'actine-G est représentée par des points rouges, l'actine-F par un trait épais rouge. Chaque protéine est schématisée en vert. [Alberts, 2002]

Ce complexe est initialement inactif, et son recrutement nécessite l'action concertée de plusieurs composants : un activateur (NPF), un filament d'actine-F préexistant, et des monomères d'actine libre (Fig 1.20, adaptée de [Goley, 2006]). Une fois recruté, le complexe Arp2/3 se lie à un filament préexistant et initie la nucléation d'un nouveau filament à un angle de 70° environ, prompt à s'allonger puisqu'il expose son bout barbé (+) [Rouiller, 2008].

Il existe de nombreuses protéines capables de recruter le complexe Arp2/3, et toutes ont en commun un motif WCA (aussi appelé VCA, [Cáceres, 2015]) en C-terminal qui leur permet [Boczkowska, 2008] d'interagir avec à la fois l'actine (via les domaines WC) et avec le complexe Arp2/3 (via les domaines CA). Ces protéines sont, elles aussi, inactivées initialement, étant donné qu'elles s'auto-inhibent en se repliant sur elles-mêmes. Ce n'est qu'en interagissant avec quelques partenaires comme le lipide $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$, la protéine CDC42 et toute protéine contenant le motif SH3, que l'activateur adopte une configuration active. Nous utilisons pour nos expériences le fragment actif de l'activateur WASp (Wiskott-Aldrich Syndrom protein), présenté Fig 1.21 (d'après [Goley, 2006]), nous affranchissant ainsi de l'étape de dépliement pour son activation. A ce fragment est ajouté une streptavidine (s) afin de le lier à un lipide biotynilé présent au sein de la membrane des liposomes. De plus une partie proline (p) permet de cibler les monomères d'actine-proline, et ainsi de renforcer l'action de polymérisation de l'actine au site d'immobilisation de s-pVCA, et donc limiter la polymérisation d'actine en solution [Carvalho, 2013a ; Blanchoin, 2014].

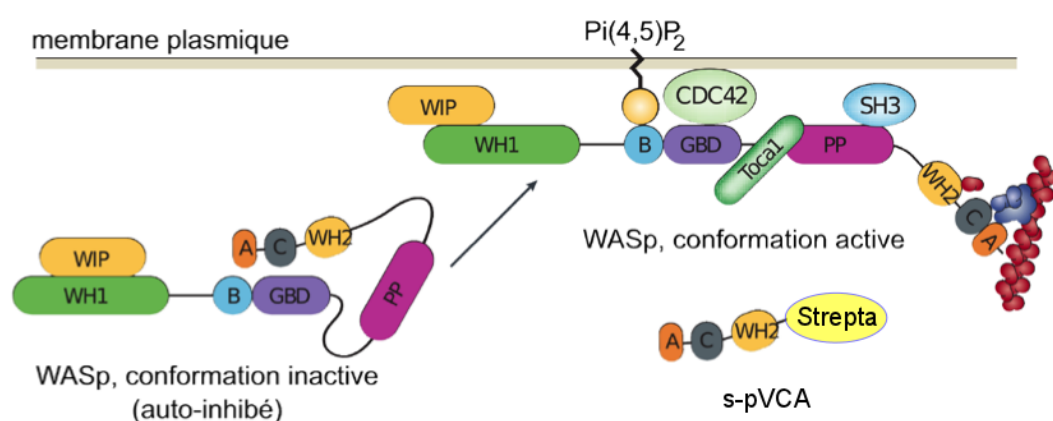


Figure 1.21 Conformations de la protéine WASp et schéma de la protéine s-pVCA. Au départ, l'activateur est auto-inhibé. Son activation est réalisée par plusieurs partenaires tels le lipide $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$, la protéine CDC42 et toute protéine contenant le motif SH3 (comme Toca1, Nck, Grb2). Pour s'assurer que l'activateur utilisé *in vitro* soit toujours déplié et ainsi en conformation active, on a remplacé tous les domaines de WIP à GDP par une streptavidine. La protéine obtenue de cette manière est appelée s-pVCA. [Goley, 2006]

Les formines

Il s'agit d'une famille de protéines dimériques qui peuvent initialiser la polymérisation en capturant deux monomères d'actine. La formine reste associée au bout barbé (+) du filament, et ajoute de nouveaux monomères qu'elle peut lier à l'ensemble [Carlier, 2010]. C'est une famille de nucléateurs processifs : ils progressent (en étant toujours au bout barbé) à mesure que le filament grandit.

Les protéines de coiffe

Pour ne pas épuiser trop rapidement la réserve d'actine-G séquestrée en polymérisant trop vite, la cellule peut tempérer la croissance des filaments d'actine à l'aide de ces protéines dites 'de coiffe' puisqu'elles interagissent fortement avec les extrémités des filaments où elles bloquent la polymérisation.

La capping protéine (CP)

Elle se lie au bout (+) du filament avec une grande affinité [Schafer, 1996], ce qui restreint les changements de longueur du filament à son bout (-). La forme du réseau d'actine obtenu peut être variée en fonction de la concentration en CP [Kawska, 2012] : très concentrée, les filaments seront trop courts pour s'enchevêtrer, peu concentrée, la croissance par le bout (-) est favorisée.

La gelsoline

En se fixant le long d'un filament, elle entraîne sa déstabilisation et il peut alors se fragmenter. La rupture laisse alors le bout barbé coiffé par la gelsoline qui empêche l'addition de nouveaux monomères [Janmey, 1987]. Cela peut transformer par transition de phase, des filaments en solution, en gel d'actine [Grazi, 1991], d'où son nom.

Les protéines de réticulation

Au sein de la cellule, on peut distinguer deux grands types d'architecture de réseau : des faisceaux composés de filaments parallèles (sans tenir compte de leur orientation), ou des réseaux plus complexes (Fig 1.22 d'après [Alberts, 2002]).

Les faisceaux

Certaines protéines comme l' α -actinine ou la fibrine peuvent, en se liant à leurs extrémités à des filaments d'actine engendrer des faisceaux plus ou moins resserrés, et donc plus ou moins rigides. La différence de distance entre filaments va également conduire à une auto-organisation des faisceaux (fagotage), les différentes protéines de liaison s'excluant mutuellement (Fig 1.22.A-B).

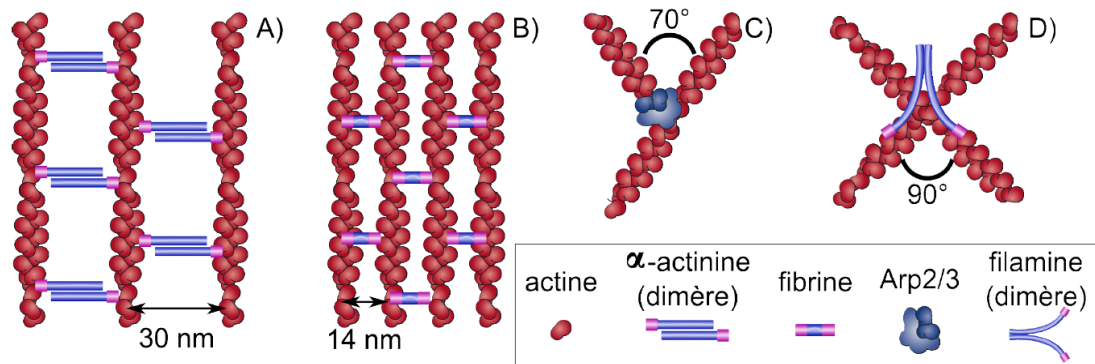


Figure 1.22 Schémas de différentes protéines de réticulation. A) Faisceau largement espacé obtenu avec l' α -actinine (homodimère court). **B)** Faisceau plus serré obtenu avec la fibrine. **C)** Branchement avec Arp2/3. **D)** Liaison souple, supportant la torsion, obtenue avec de la filamine (homodimère long). [Alberts, 2002]

Les réseaux

On a déjà vu que le complexe Arp2/3 était capable de former un branchement sur un filament existant (Fig 1.20-1.22.C), ce qui peut être à l'origine d'un réseau, mais en fait n'importe quelle protéine pouvant se lier en deux sites distincts à l'actine-F séparés par une longue jonction peut former un réseau à trois dimensions. La filamine par exemple (Fig 1.22.D) permet de lier deux filaments d'actine adjacents orthogonaux.

Les drogues affectant la polymérisation d'actine

Il existe des toxines capables d'interagir avec l'actine. En particulier, la latrunculine qui peut inhiber sa polymérisation en se liant à l'actine-G, et la phalloïdine qui s'attache spécifiquement à l'actine-F et empêche sa dépolymérisation. On a ici décrit comment à partir d'une dynamique simple de tapis roulant, la polymérisation et la dépolymérisation pouvaient être régulées par différentes protéines pour obtenir divers réseaux d'actine complexes. La Fig 1.23 (tirée de [Alberts, 2002]) résume rapidement les différentes protéines abordées. De plus, ces réseaux *in vivo* se déforment sous l'action de moteurs moléculaires, en particulier les myosines.

d) Les myosines

Cette famille de moteurs moléculaires est composée d'au moins 20 classes différentes (Fig 1.24 adaptée de [Hodge, 2000]). Ces moteurs utilisent l'ATP comme source d'énergie nécessaire à la contraction musculaire [Szent-Györgyi, 1945], et participent à de nombreuses fonctions intracellulaires comme la migration, l'adhésion, la localisation des organelles ou encore le transport intracellulaire. On s'intéressera en particulier à la myosine VI, puisque sa participation à des mécanismes impliquant une large déformation de la membrane plasmique a été plusieurs fois étudiée : endocytose [Aschenbrenner, 2004], et froissement de la membrane ('membrane ruffles') [Buss, 1998].

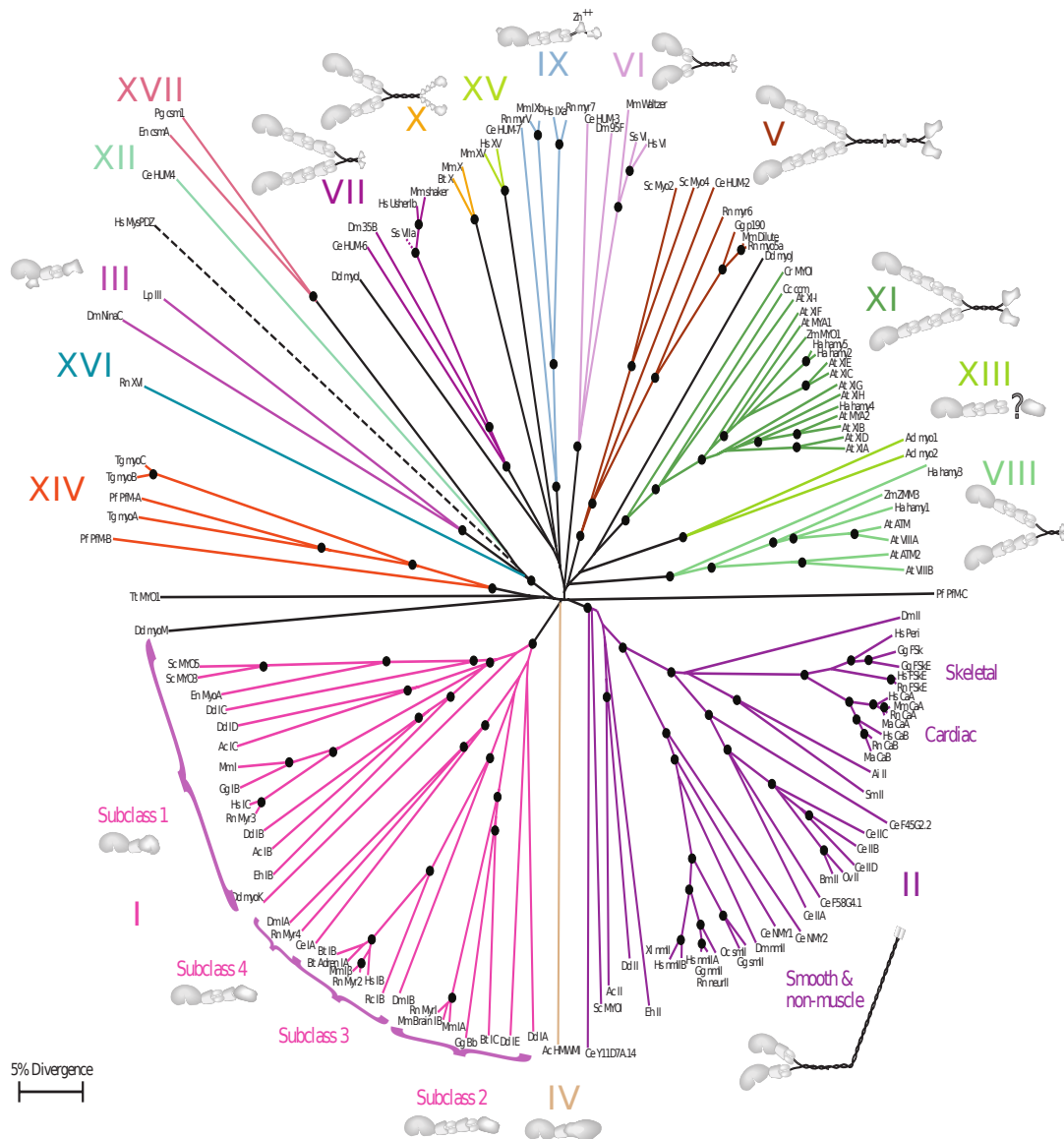


Figure 1.24 Arbre phylogénétique sans racine d'une partie de la superfamille des myosines, obtenu grâce à la comparaison de 139 membres. Lorsque la structure principale d'une myosine appartenant à une classe donnée est connue, un schéma représentatif est proposé à côté de la classe correspondante. [Hodge, 2000]

La myosine VI (comme toutes les myosines) est constituée (1) d'une tête (ou domaine moteur) qui est le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, et qui peut se lier à de l'actine-F, (2) d'un cou (ou bras de levier) capable de recruter des chaînes légères comme la calmoduline et (3) d'une queue permettant l'interaction spécifique avec diverses partenaires cellulaires (cf Fig 1.25 tirée de [Buss, 2004]). Elle peut également constituer un dimère (comme le montre le petit schéma de la Fig 1.24) capable de se déplacer le long d'un filament d'actine (myosine processive), vers son bout pointu (-) [Wells, 1999], ce qui la différencie des autres myosines processives qui se dirigent toutes vers le bout barbé (+).

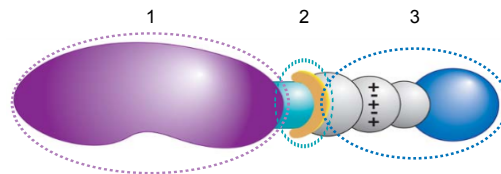


Figure 1.25 Structure de la myosine VI. De gauche à droite, on peut observer (1) en violet la tête de la myosine, (2) en turquoise le cou (ici associé à la calmoduline en jaune), (3) en gris puis bleu, respectivement la partie hélicoïdale et la partie globulaire de la queue. [Buss, 2004]

Les interactions des myosines avec l'actine-F ont été proposées par Lymn et Taylor dès 1971 [Lymn, 1971]. Elles s'inscrivent dans un cycle à quatre temps (Fig 1.26 tirée de [Cecchini, 2010]) où l'état correspondant au repos est qualifié de 'rigor', la myosine étant liée au filament. La consommation d'ATP permet de sortir de cet état et de fournir une poussée au filament, à la manière d'un rameur d'aviron qui laisserait sa pagaie dans l'eau à chaque coup de rame (stroke).

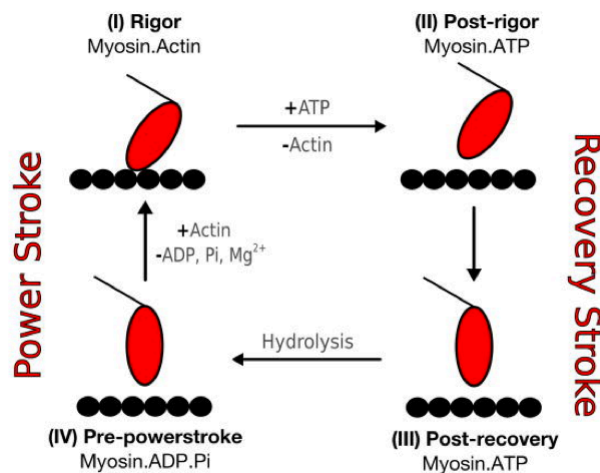


Figure 1.26 Cycle de Lymn-Taylor. [Cecchini, 2010]

La myosine VI est le plus souvent (90 % du temps) dans l'état 'rigor' [De La Cruz, 2001], et elle est capable d'effectuer des grands pas de 36 nm sur le

filament d'actine. Son cycle de fonctionnement est représenté Fig 1.27 (tirée de [Llinas, 2015]).

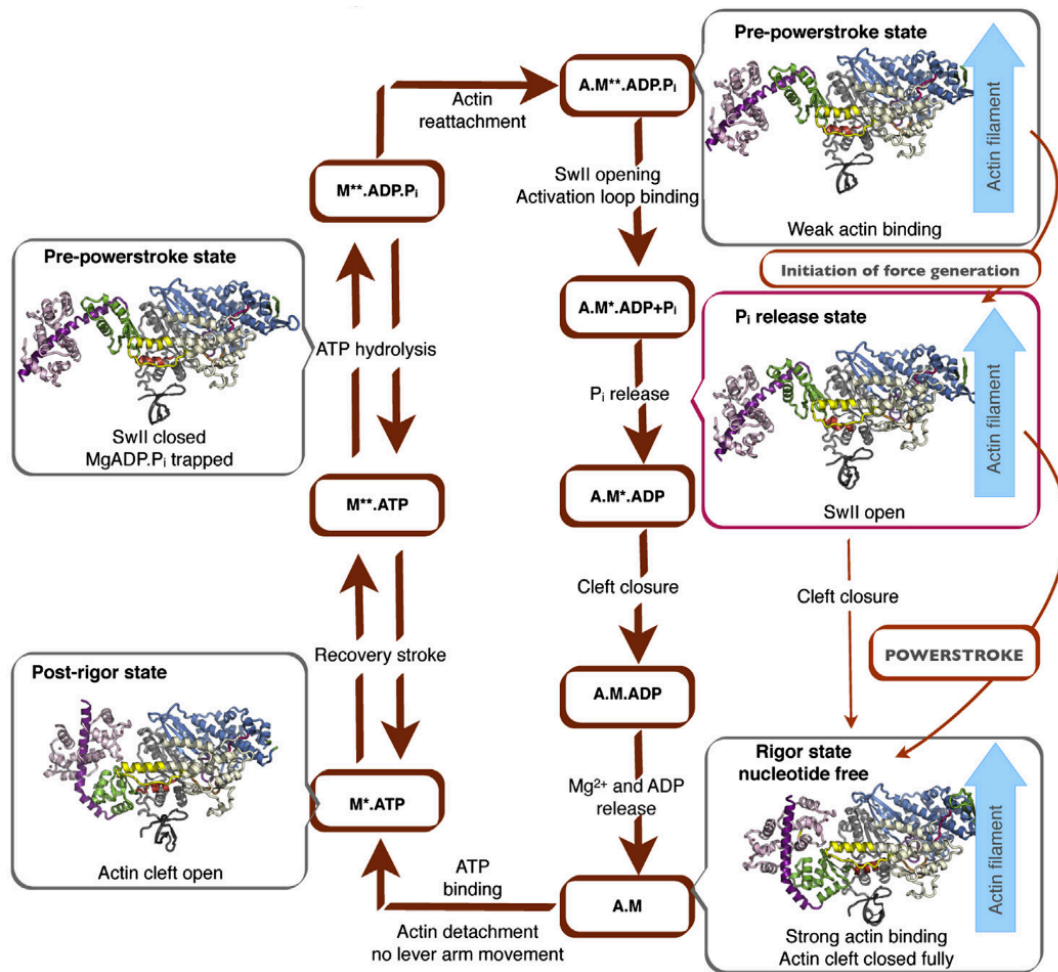


Figure 1.27 Cycle de fonctionnement détaillé de la myosine VI. L'état au repos correspond au schéma en bas à droite. La fixation d'une molécule d'ATP détache la myosine du filament, l'hydrolyse de l'ATP en ADP-Pi permet à la tête de la myosine de se déplier. Sa nouvelle conformation lui permet de s'attacher à un filament d'actine. Lors de cette phase d'accroche, la tête de myosine relâche le phosphate, et entraîne en changeant sa conformation, un déplacement du filament d'actine. [Llinas, 2015]

Les notions de biochimie introduites au cours de ce premier chapitre sont à la base de mon sujet de thèse, c'est-à-dire au cœur de la motilité et du changement de forme cellulaire.

4) Cytosquelette et changement de forme cellulaire

Maintenant que l'on a pu détailler les principales protéines liées au cytosquelette d'actine, on peut revenir sur les changements de forme cellulaire structures cellulaires où cytosquelette d'actine et déformation membranaire sont particulièrement associés.

a) Le cortex d'actine

Le cortex d'actine est un réseau complexe de filaments d'actine attachés sur la face interne de la membrane plasmique. Outre l'actine, ce réseau comporte de nombreuses protéines de régulation comme les myosines. Sa structure microscopique (Fig 1.28 tirée de [Morone, 2006]), étudiée sur différents types cellulaires, a mis en évidence son caractère isotrope. La taille de maille du réseau d'actine varie entre 20 et 250 nm [Salbreux, 2012].

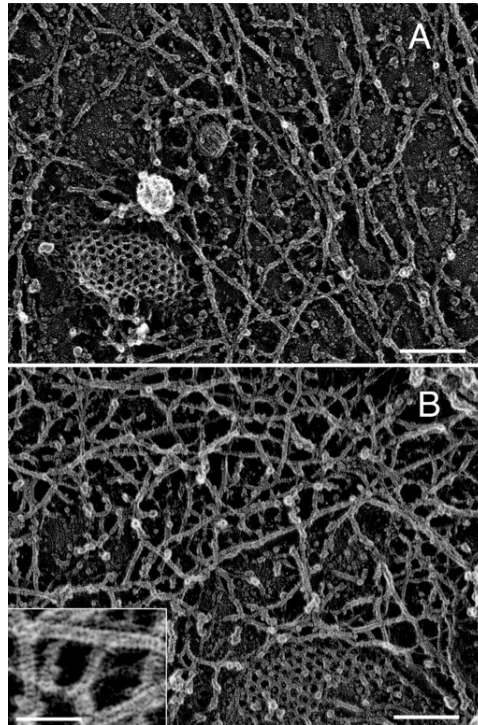


Figure 1.28 Microscopie électronique de la surface interne d'une membrane plasmique de cellules de rat. A Fibroblast (NRK) échelle de 100 nm. B Kératynocyte (FRSK) échelle de 100 nm (50 nm pour l'insert). [Morone, 2006]

Les propriétés mécaniques du cortex seul sont complexes à analyser *in vivo*, puisque celui-ci est lié à la membrane plasmique. Toutefois, des mesures de tension corticale ont pu être effectuées sur des cellules non adhérentes en utilisant un microscope à force atomique (AFM) [Cartagena-Rivera, 2016]. Lorsque la tension corticale est uniforme, et avec l'augmentation de celle-ci, comme dans les dernières étapes de la division cellulaire, la cellule s'arrondit [Théry, 2008]. Par contre, lorsque la tension corticale n'est plus uniforme à l'échelle de la cellule, les différents gradients de contractilité peuvent aboutir à déformer la membrane [Salbreux, 2012]. Ainsi à la fin de l'anaphase, il y a réorganisation du cortex dans la partie médiane de la cellule pour former un anneau contractile [Miller, 2011] qui va créer le sillon de division précédant la division de la cellule mère en deux cellules filles.

b) Le lamellipode

C'est une structure cellulaire de 200 nm d'épaisseur que l'on peut trouver à l'avant d'une cellule en migration. La polymérisation à la membrane d'un réseau dendritique dense d'actine permet de pousser la membrane plasmique dans le sens de la reptation (Fig 1.29 tirée de [Pollard, 2000]).

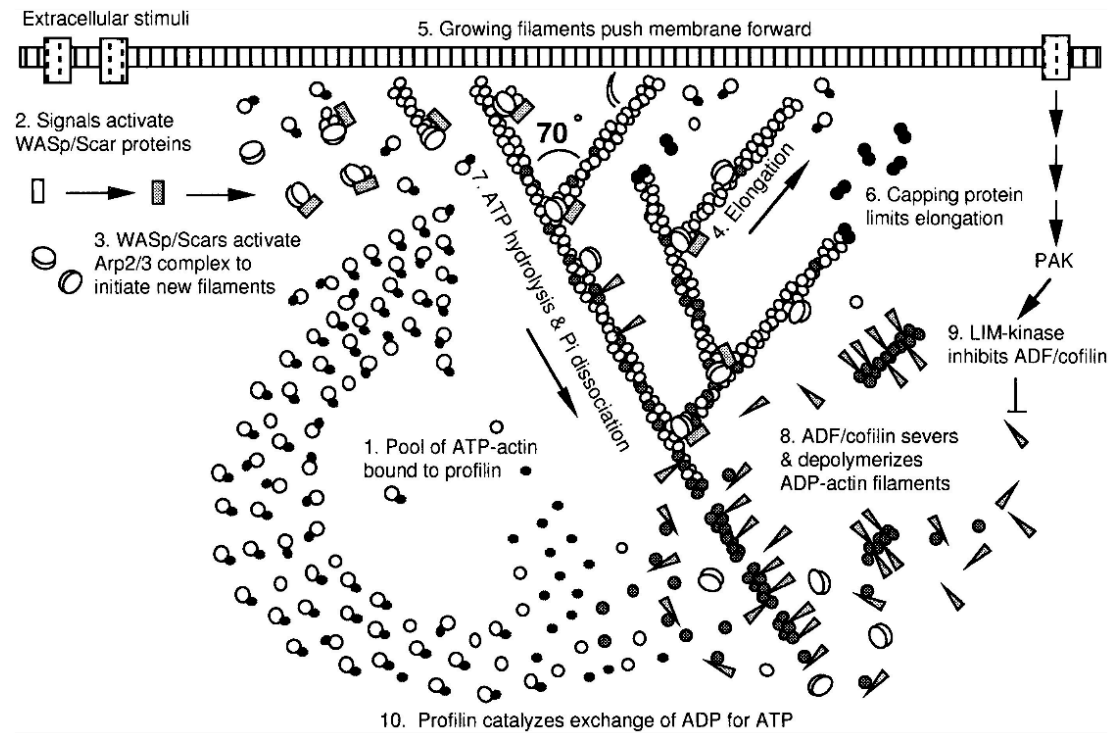


Figure 1.29 Représentation de nucléation dendritique d'actine à la membrane d'un lamellipode.
[Pollard, 2000]

c) Tubes de membrane sous-tendus par des filaments d'actine

A la membrane, on peut trouver des structures tubulaires qui sont reliées à la dynamique de polymérisation d'actine.

Filopodes et pseudopodes

Les filopodes sont des protrusions quasi-unidimensionnelles qui se trouvent à l'avant des cellules en migration. Les filaments d'actine y sont parallèles, assemblés en faisceaux. Les pseudopodes sont des excroissances un peu plus volumineuses, sous-tendues par de l'actine réticulée.

Tube pollinique

Dans les plantes à graines (spermaphytes), il s'agit du tube construit par un grain de pollen après germination, qui lui permet d'amener son matériel génétique jusqu'à l'ovule de la plante. La construction de la structure en faisceaux des filaments d'actine est encore mal comprise, mais l'ensemble ressemble à un filopode [Vidali, 2001].

Tube dû à l'endocytose

L'endocytose est le mécanisme de transport d'éléments extérieurs vers l'intérieur de la cellule. Toutes les cellules eucaryotes peuvent ainsi internaliser des molécules spécifiques. En déformant suffisamment leur membrane plasmique pour créer une concavité, puis en déplaçant cette invagination vers l'intérieur de la cellule (Fig 1.30 tirée de [Kaksonen, 2006]), il se forme alors entre la surface de la cellule et la vésicule d'endocytose un tube de membrane qui peut perdurer plusieurs dizaines de secondes avant qu'il ne se casse [Kaksonen, 2005]. Il a été montré que plusieurs types de myosine, dont la myosine VI, étaient essentielles pour les premières étapes de l'endocytose [Buss, 2001]. La polymérisation d'actine régulée par plusieurs acteurs aurait un rôle important dans la déformation primordiale de la membrane (invagination) ainsi que dans la fission de tels tubes de membrane [Miserey-Lenkei, 2010].

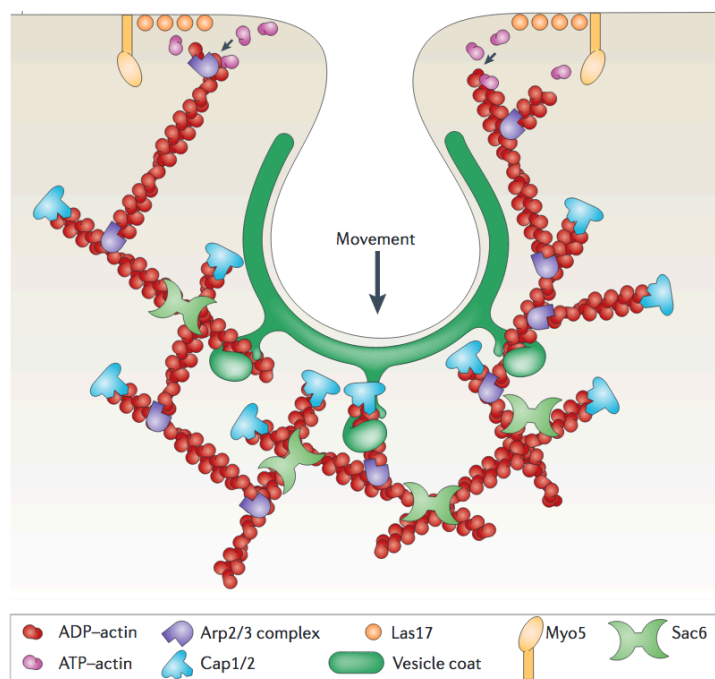


Figure 1.30 Schéma d'endocytose dirigé par la polymérisation d'actine. [Kaksonen, 2006]

L'étude des liens entre cytosquelette et déformation cellulaire *in vivo* a ainsi permis d'identifier plusieurs structures caractéristiques complexes.

5) Conclusion

Au cours de ce chapitre, on s'est d'abord penché sur une simple observation : les cellules ne sont pas toujours rondes ! L'étude de la couche extérieure de ces cellules, ou membrane plasmique, a révélé que les déformations observées ne pouvaient être imputables uniquement à la membrane, et qu'il fallait chercher une origine à ces déformations dans le cytosquelette d'actine. Les différents acteurs de la polymérisation d'actine sont en effet présents *in vivo* lors de divers phénomènes biologiques (reptation, division, endocytose). Dans le chapitre suivant, je vais présenter les techniques *in vitro* que j'ai employées pendant ma thèse pour reconstruire les structures qui mêlent cytosquelette et changement de forme.

Chapitre II

Systèmes biomimétiques pour l'étude de la déformation de la membrane plasmique

Sommaire :

- 1) Reconstitution d'un cortex d'actine sur un liposome
 - a- Diriger la polymérisation
 - b- Observations sur un cortex externe
 - c- Observations sur un cortex interne
- 2) Tube de membrane
 - a- Physique du tube
 - b- Principe de la pince optique
 - c- Mesures de force
- 3) Conclusion

Précédemment, nous avons exposé que la compréhension des changements de forme cellulaire chez les cellules eucaryotes nécessite non seulement de connaître la physique de leur membrane plasmique, mais aussi leur cytosquelette. Cependant, *in vivo*, il existe de très nombreuses protéines susceptibles de se lier à l'actine (ABPs), ce qui entraîne des effets de compétition rendant l'interprétation de diverses modifications (ajout de drogues pour perturber la polymérisation, inhibition d'une protéine par ARN interférant) plus ardue. Il est alors difficile d'isoler toutes les causes de déformations possibles de la membrane plasmique. On peut alors privilégier une approche 'bottom-up', c'est-à-dire construire *in vitro* un système simple (le liposome) que l'on va progressivement rapprocher du cas *in vivo* en ajoutant un par un les différents composants du cytosquelette. Dans cette perspective de partir du simple liposome pour arriver au plus près des comportements cellulaires réels observés au chapitre I.4, ce chapitre présente dans un premier temps la reconstitution d'un cortex d'actine sur un liposome et l'étude de la déformation de celui-ci, puis dans un second temps, on s'intéressera aux techniques permettant de reproduire les tubes de membrane vus dans le cadre de l'endocytose, et à en mesurer les caractéristiques.

1) Reconstitution d'un cortex d'actine sur un liposome

L'actine polymérisant naturellement en solution (I.3.a), si on souhaite reconstruire un cortex d'actine, il faut polymériser l'actine localement, à la surface d'une membrane. Après avoir décrit comment, en utilisant les protéines de régulation de l'actine, il est possible de diriger la polymérisation, on s'intéressera d'abord à la polymérisation d'un cortex externe au liposome, plus aisé à réaliser expérimentalement, puis au cas du cortex interne, plus physiologique.

a) Diriger la polymérisation

La polymérisation de l'actine-G en actine-F nécessite la présence de sels (par exemple Mg^{2+}), qui peuvent alors initier la création d'un noyau de trois monomères à partir duquel un filament peut grandir (I.3.b). On a vu que la profiline empêchait la nucléation spontanée en séquestrant les monomères d'actine, il faut donc utiliser un nucléateur de la polymérisation d'actine pour créer le noyau nécessaire à la formation du filament. On peut choisir d'utiliser le complexe Arp2/3 (I.3.c) libre dans le cytoplasme, mais ayant besoin d'être recruté par une protéine promouvant la nucléation (NPF), par exemple S-pVCA (I.3.c), afin de créer un filament. L'attachement de ce NPF à la membrane garantit alors la polymérisation localisée de l'actine-G en actine-F.

Ces différents éléments réunis, on peut s'attendre à la formation d'un réseau d'actine branché à sa surface (Fig 2.1, tirée de [Carvalho, 2013a]).

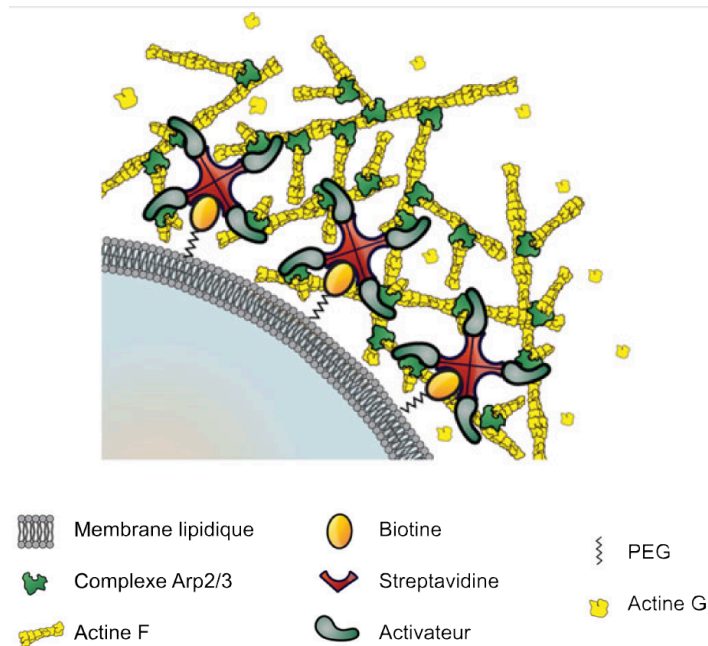


Figure 2.1 Schéma du réseau d'actine branché sans CP. Les lipides biotinylés du liposome permettent d'accrocher l'activateur (S-pVCA) du nucléateur (Arp2/3). Le complexe Arp2/3 peut ensuite se fixer sur un filament existant pour créer un nouvel embranchement (protéines pas à l'échelle). [Carvalho, 2013a]

L'ajout de la « capping protein », CP (introduite au I.3.c), limite la taille des filaments (Fig 2.2 tirée de [Carvalho, 2013a]), en venant se placer au bout barbé (+). Le réseau est alors plus dense, et surtout capable d'accumuler des contraintes [Kawska, 2012].

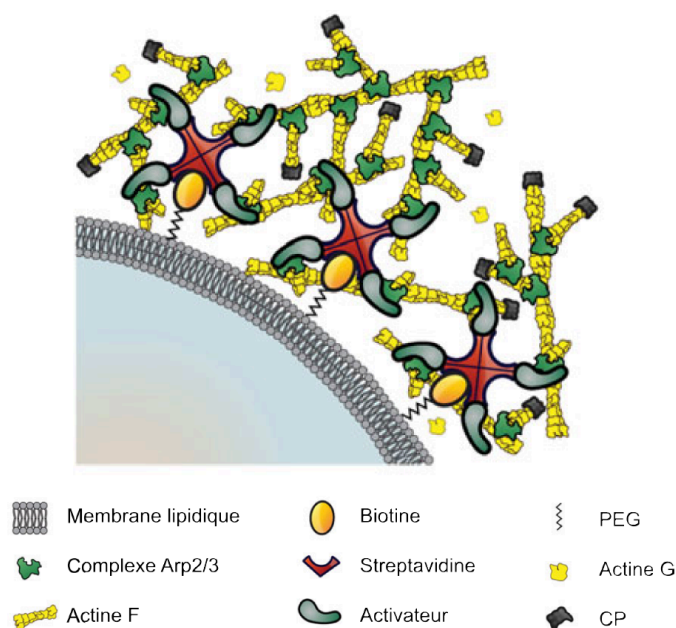


Figure 2.2 Schéma du réseau d'actine branché avec CP. L'ajout de nouveau monomère d'actine-G ne peut avoir lieu qu'à la membrane (protéines pas à l'échelle). [Kawska, 2012]

b) Observations sur un cortex externe

En réalisant ces expériences en polymérisant l'actine à l'extérieur du liposome, on observe l'apparition d'un cortex d'actine comme le montre la Fig 2.3 (tirée de [Carvalho, 2013a]). L'ajout de CP favorise ainsi l'inhomogénéité et la brisure du cortex. Il existe toutefois une concentration critique (dépassée Fig 2.3.D) au-delà de laquelle les filaments sont trop courts, ce qui empêche l'enchevêtrement des filaments d'actine trop courts et l'augmentation de la tension globale.

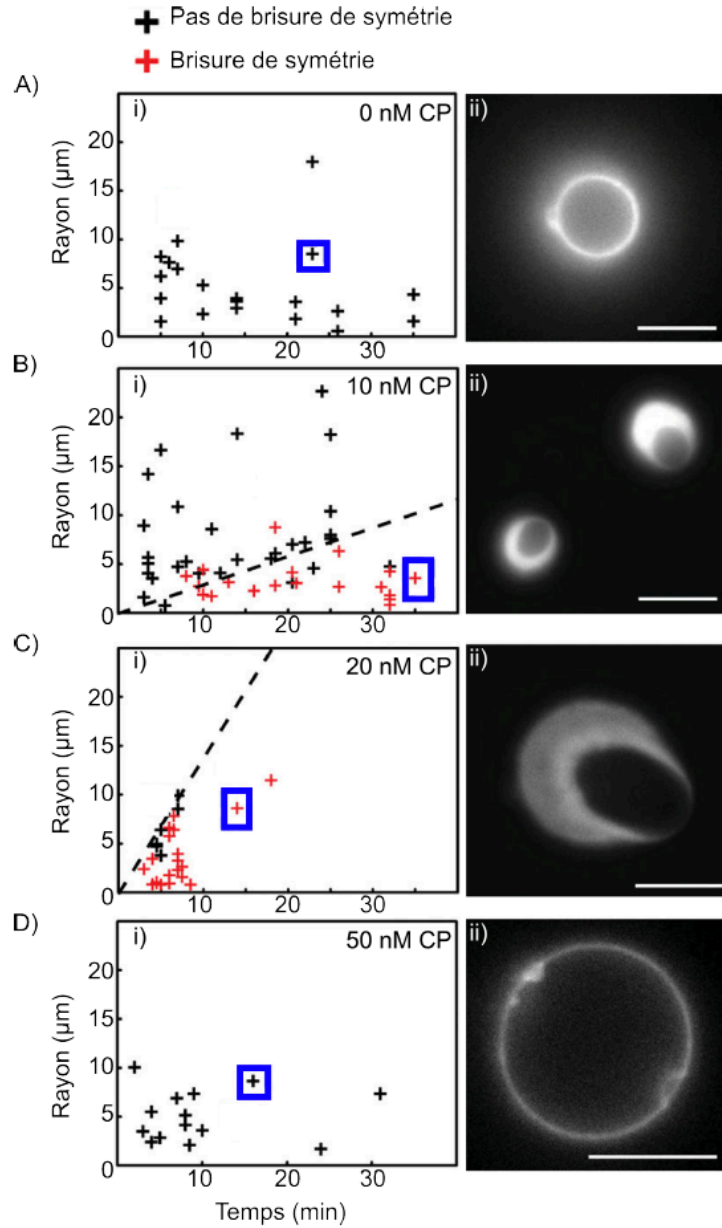


Figure 2.3 Polymérisation d'un réseau d'actine et brisure de symétrie. ii Images A-B-D en épifluorescence, C au spinning disk. Echelles de 10 μm . i Observation de la taille des liposomes en fonction du temps, 0 étant le début de la polymérisation. Chaque liposome est représenté par une croix, celle encadrée est le liposome correspondant en ii. La droite en pointillés indique la limite entre réseaux homogènes et réseaux brisés. [Carvalho, 2013a]

Lorsqu'il y a brisure de symétrie, le liposome est expulsé du réseau, créant une comète propulsant le liposome et le pinçant, selon le même phénomène étudié dans [Plastino, 2005] et [van der Gucht, 2005]. Cette dynamique de polymérisation a permis de comprendre la propulsion des *Listeria monocytogenes*, qui sont des bactéries capables de détourner la machinerie cellulaire en créant une comète d'actine pour sortir du cytoplasme d'une cellule infectée pour atteindre une nouvelle cellule (Fig 2.4 tirée de [Tilney, 1989 ; Cossart, 1998]).

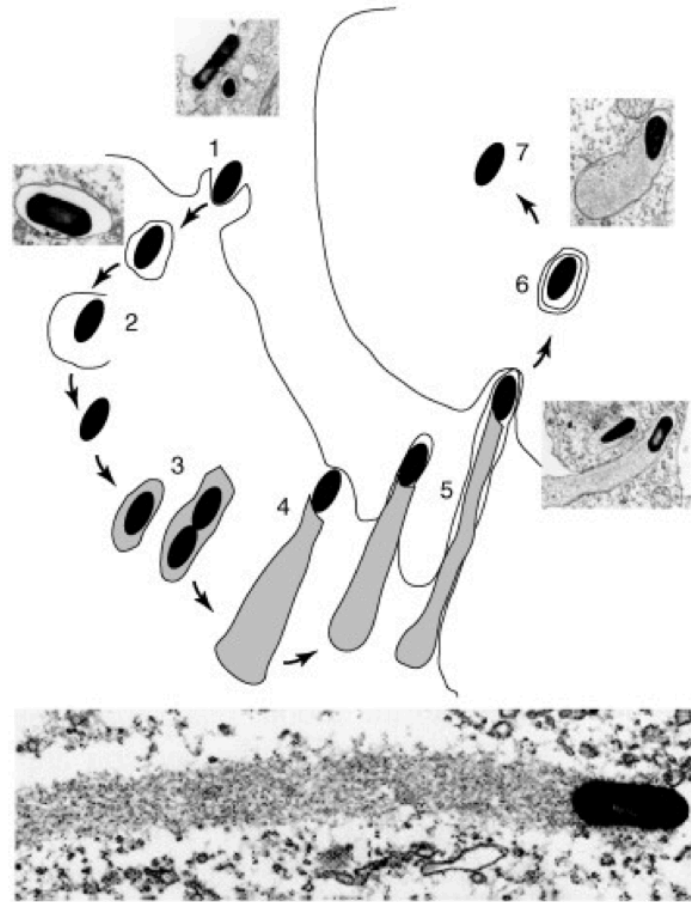


Figure 2.4 Cycle de contamination de la *Listeria*. Chronologie du mécanisme d'entrée de la bactérie et de la contamination d'une cellule voisine, illustrée par quelques images en lumière blanche (longueur typique de la bactérie : 1 μ m). [Tilney, 1989 ; Cossart, 1998]

c) Observations sur un cortex interne

Pour mimer le réseau d'actine sous-jacent à la membrane plasmique comme au I.4.a, il faut réussir à recréer un réseau d'actine au niveau de la surface interne d'un liposome (Fig 2.5 tirée de [Lemiere, 2014]). Il s'agit alors d'encapsuler, lors de la formation de liposomes par émulsion inverse, la même solution de protéines (S-pVCA, actine-G, profiline, Arp2/3 et CP ou non). Cependant, le volume de chaque liposome étant limité ($\approx 0.5 \mu\text{m}^3$), le réseau n'a

accès qu'à une quantité restreinte d'actine-G, et cela engendre une déformation de la membrane non mesurable.

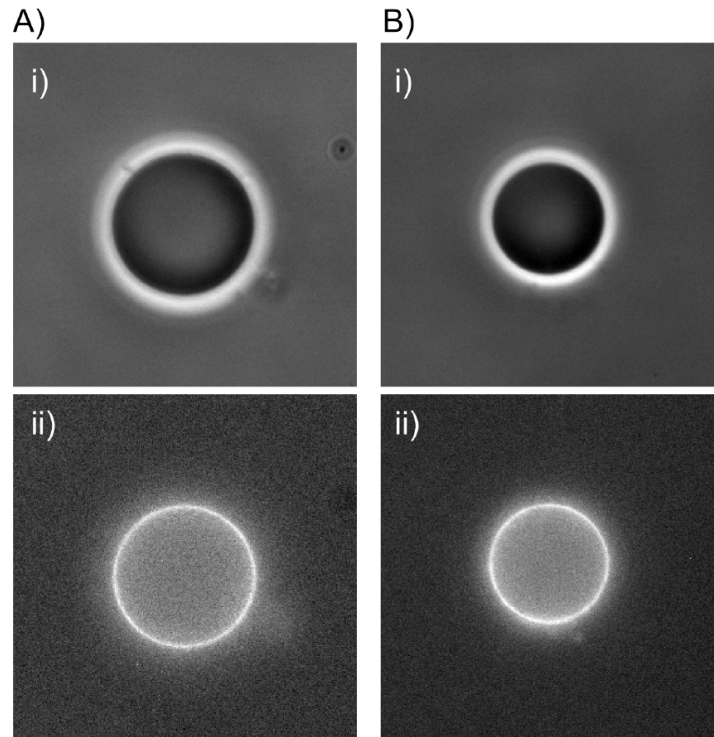


Figure 2.5 Polymérisation d'un cortex d'actine à la surface interne de liposomes formés par émulsion inverse. i) contraste de phase ii) épifluorescence, actine marquée par Alexa A-488. A) Solution intérieure contenant l'activateur de la polymérisation, le complexe Arp2/3, l'actine-G et la profiline. B) Même composition que A) avec 37 nM de CP.

On a donc un système *in vitro* semblable à un cortex d'actine tel que celui que l'on peut trouver au niveau de la membrane plasmique d'une cellule eucaryote (cortex interne). Pour finir de reproduire les structures identifiées au chapitre I.4 (le cortex d'actine et les filopodes), et mieux comprendre le mécanisme d'endocytose assisté par la polymérisation d'actine, a priori indispensable à l'internalisation des vésicules d'endocytose [Renard, 2014], il nous reste à construire une nouvelle géométrie : le nano-tube de membrane.

2) Tube de membrane

Pour créer un tube membranaire *in vitro* qui pourrait être l'analogue des structures *in vivo* observées au chapitre I.4, j'ai pu profiter de ressources directement accessibles au sein de l'unité, puisqu'une large partie des connaissances sur les tubes de membrane a été initiée dans l'équipe de Pierre Nassoy [Nassoy, 2008] et Patricia Bassereau [Manneville, 2001], en collaboration avec le groupe théorie de Jacques Prost. En partant du fait que l'application d'une force perpendiculairement à la surface d'un liposome conduit à la formation d'un tube très fin, on peut fixer un liposome sur une surface puis le

forcer à s'éloigner pour obtenir un tube. Différentes méthodes existent, comme l'aspiration dans une micropipette [Evans, 1994, 1996], ou l'action d'un flux [Bar-Ziv, 1994 ; Waugh, 1982], ou encore l'utilisation de pinces optiques [Cherney, 2004]. Avant d'aborder la mesure de forces dans ce dernier cas, on va dans un premier temps étudier les caractéristiques théoriques de ce tube, en développant le modèle d'Helfrich décrit au paragraphe I.2.b.

a) Physique du tube

La géométrie du tube de membrane, que l'on supposera parfaitement cylindrique, est prédite par la théorie [Derényi, 2002], qui donne (à partir de l'hamiltonien d'Helfrich) l'énergie libre du tube de membrane H_{tube} , qui fait apparaître l'énergie de courbure de la membrane, l'énergie élastique liée à sa tension, et le travail du tube.

$$H_{tube} = 2 \pi R_t L_t \left(\frac{\kappa}{2 (R_t)^2} + \sigma \right) - f L_t \quad Eq\ 2.1$$

Avec R_t le rayon du tube a priori non fixé, L_t sa longueur, f la force qui tire le tube. En minimisant cette énergie par rapport au rayon puis la longueur du tube, on obtient un système d'équations qui permet d'obtenir r_{tube} le rayon du tube à l'équilibre ainsi que f_{tube} la force statique nécessaire au maintien du tube. Cet équilibre est atteint en quelques secondes dans les conditions de notre expérience, comme indiqué dans [Campillo, 2013] ou mes propres courbes de force (Fig 3.15) qui présentent un plateau après 30 secondes d'attente après tirage.

$$\begin{cases} \frac{\partial H_{tube}}{\partial R_t} = 0 = 2 \pi L_t \sigma - \pi L_t \kappa / (r_{tube})^2 \\ \frac{\partial H_{tube}}{\partial L_t} = 0 = 2 \pi r_{tube} \left(\frac{\kappa}{2 (r_{tube})^2} + \sigma \right) - f_{tube} \end{cases}$$

Soit :

$$\begin{cases} r_{tube} = \sqrt{\frac{\kappa}{2 \sigma}} \\ f_{tube} = 2 \pi \sqrt{2 \sigma \kappa} \end{cases} \quad Eq\ 2.2$$

On remarque alors que le rayon et la force ainsi trouvés sont indépendants de la longueur du tube. L'augmentation de la tension est par ailleurs défavorable à l'extraction de tubes, la force de maintien dépendant de la racine carrée de la tension. Lorsque la longueur du tube est suffisamment grande (de l'ordre du micron, [Roux, 2005]) pour dépasser la simple déformation de membrane, et atteindre la forme de tube, mais suffisamment petite pour qu'il

il y ait encore un réservoir de lipides disponibles pour former le tube (plus petit que la centaine de microns [Rossier, 2003]), la longueur du tube ne dépend ni de la tension de la membrane, fixée uniquement par l'aspiration de la micropipette, ni de la force de tirage de tube [Roux, 2005]. C'est donc l'expérimentateur qui fixe la longueur du tube.

b) Principe de la pince optique

Expérimentalement, on peut obtenir un tel tube en maintenant un liposome dans une micropipette, en exerçant une dépression, et en utilisant une bille piégée dans une pince optique capable de se lier à la membrane, comme présenté sur la Fig 2.6.

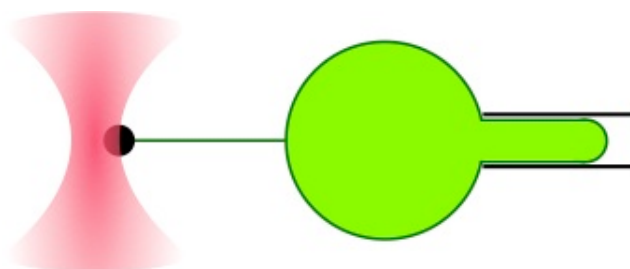


Figure 2.6 Représentation schématique d'un liposome aspiré par une micropipette, et tiré par une bille piégée dans une pince optique de l'autre côté.

La pince optique est une technique très utilisée en biophysique qui permet de piéger des objets plus réfringents que leur environnement (indice optique plus élevée que le milieu), dans le plan focal d'un microscope en utilisant la focalisation d'un laser puissant. La déviation d'un faisceau lumineux par un dioptré crée une force qui compense le changement de quantité de mouvement des photons, ce qui peut, dans le cas d'une bille de polystyrène dans de l'eau, aboutir à la piéger (Fig 2.7 tirée de [Bussonnier, 2014]).

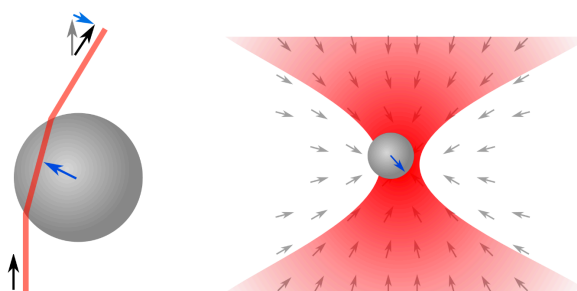


Figure 2.7 Principe de fonctionnement de la pince optique. A gauche, la lumière déviée par une bille transparente change la quantité de mouvement des photons (flèches noires), ce qui se traduit par l'application d'une force dans le sens opposé à cette déviation. A droite, ce principe est généralisé dans le cas de la focalisation d'un faisceau laser. Les flèches grises montrent le champ de force résultant pour les positions de la bille correspondantes. [Bussonnier, 2014]

Dans le cadre d'un faisceau laser focalisé, une force va alors tendre à ramener la bille vers le point de focalisation. Cette force F_{trap} s'apparente à une force de rappel de ressort, de constante de raideur k_{trap} lorsque l'objet piégé est sphérique et d'une taille supérieure à la longueur d'onde du laser utilisé [Rocha, 2009]. Pour une distance d entre le centre du piège et le centre de la bille, on a ainsi (tant que la bille reste dans le faisceau [Richardson, 2008]) :

$$F_{trap} = k_{trap} d \quad \text{Eq 2.3}$$

Toutefois, une partie du faisceau incident va aussi se réfléchir sur la surface de la bille ce qui rajoute une force qui tend à pousser la bille dans le sens de propagation du laser : la pression de radiation [Ashkin, 1971]. Expérimentalement, cela se traduit dans la manière de créer un piège pour attraper une bille : dans le cas où le faisceau laser incident provient du bas de la chambre d'observation, si le piège est créé en dessous de la bille, la pression de radiation sera potentiellement plus forte que la force de piégeage, ce qui peut amener la bille à être propulsée vers le haut de la chambre sans la piéger. A cet effet, il faut encore ajouter l'échauffement dû à la focalisation du laser qui peut être fatal au matériel biologique pour un laser visible de 100 mW. Toutefois, l'utilisation d'un laser infra-rouge ($\lambda = 1064$ nm), dans l'eau, permet (toujours pour une puissance de l'ordre de 100 mW) de réduire cet effet à une faible augmentation de température de l'ordre du degré Kelvin [Peterman, 2003].

c) Mesures de force

L'utilisation d'une pince optique permet non seulement de piéger une bille, rendant possible les expériences de tirage de tube de membrane *in vitro*, mais cette méthode est également capable de caractériser ces tubes en donnant accès à la force de maintien du tube, accessible à partir de la distance d entre le centre de la bille et le centre du piège (Eq 2.3). Il est tout de même nécessaire de connaître au préalable la constante de raideur du piège k_{trap} .

Il existe de nombreuses méthodes pour connaître k_{trap} , en étudiant par exemple les déviations de la position de la bille en déplaçant la chambre d'observation à une vitesse connue, ce qui revient à chercher un équilibre entre force de rappel de ressort et force visqueuse de type Stokes [Hénon, 1999], ou en utilisant le fait que la bille, tout en étant piégée dans la pince optique, diffuse en respectant le théorème d'équipartition de l'énergie [Florin, 1998]. On peut également se servir des fluctuations de la position de la bille à l'aide de l'étude

de la densité spectrale de puissance (ou PSD) de d . C'est cette méthode, simple à mettre en œuvre puisqu'elle ne nécessite pas de mouvements de la chambre, et rapide (de l'ordre de la seconde), que j'ai suivie au cours de cette thèse, et dont je vais détailler les caractéristiques. Lorsqu'une bille est piégée dans une pince optique, elle subit la force de rappel du piège, les forces de frottement visqueuses (Stokes), et enfin les forces liées à l'agitation thermique, qui dépendent du temps, que l'on nommera $\Gamma(t)$. On aboutit alors à l'équation de Langevin suivante :

$$k_{trap} d(t) + 6\pi\eta r_{bead} \dot{d}(t) = \Gamma(t) \quad Eq\ 2.4$$

Où η représente le coefficient de viscosité dynamique de l'eau, et r_{bead} le rayon de la bille. En utilisant la notion de transformée de Fourier (notée $\sim$), définie dans l'Eq 2.5 (avec f la fréquence de Fourier considérée), on peut alors réécrire l'Eq 2.4 pour s'affranchir de la dérivation par rapport au temps.

$$\tilde{X}(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} X(t) e^{-i2\pi f t} dt \quad Eq\ 2.5$$

$$k_{trap} \tilde{d}(f) + 12i\pi^2\eta r_{bead} f \tilde{d}(f) = \tilde{\Gamma}(f) \quad Eq\ 2.6$$

On peut alors introduire la densité spectrale de puissance (PSD) de la position de la bille, qui, en prenant T_{exp} comme étant la durée de l'expérience, est définie par :

$$PSD(f) = \frac{\|\tilde{d}(f)\|^2}{T_{exp}} = \frac{1}{T_{exp}} \times \frac{\|\tilde{\Gamma}\|^2 / k_{trap}^2}{1 + f^2 / f_c^2}, \quad f_c = \frac{k_{trap}}{12\pi^2\eta r_{bead}} \quad Eq\ 2.7$$

En faisant subir cette transformation aux données de la position d'une bille piégée, on doit donc obtenir une Lorentzienne, aboutissant à un plateau pour f extrapolée en 0, synonyme de régime élastique (effet du ressort optique). L'ajustement de la fréquence de coupure f_c à la PSD obtenue permet de mesurer la constante de raideur du piège k_{trap} , et donc d'accéder à la mesure de force sur la bille grâce à la relation Eq 2.3.

3) Conclusion

Pour reproduire *in vitro* les structures biologiques observées *in vivo* au chapitre I, on a, au cours de ce chapitre, développé différentes techniques qui

permettent de mimer ces aspects différents de la cellule. L'imitation du cortex d'actine collé à la membrane plasmique a ainsi permis une meilleure compréhension de sa dynamique dans la cellule. Pour comprendre plus finement les mécanismes faisant intervenir la polymérisation de l'actine dans l'endocytose, on a détaillé la reproduction de nano-tubes de membrane lisse tels qu'ils peuvent se former entre une vésicule d'endocytose et la membrane plasmique (ou dans le bourgeonnement de l'appareil de Golgi). Dans le chapitre suivant, on abordera la mise en place d'un dispositif de mesure de force sur des nano-tubes de membrane modèle, et on étudiera en particulier leurs fluctuations.

Chapitre III

Mesures à haute résolution de fluctuations de nano-tubes de membrane

Sommaire :

- 1) Commande de la pince
 - a- Miroirs galvanométriques
 - b- SLM
 - c- Amplificateur acousto-optique (ou AOD)
- 2) Montage initial
- 3) Détection par QPD
 - a- Technique du ‘Back focal plane’
 - b- Calibration de la QPD
- 4) Vérifications et améliorations du dispositif
 - a- Distribution de positions
 - b- Diminution du bruit
 - c- PSD et hautes fréquences
 - d- Alignement des optiques
- 5) Validation du montage
 - a- Distribution de positions
 - b- PSD et hautes fréquences
- 6) Mesures de modules de courbure
 - a- Protocole expérimental
 - b- Résultats
- 7) Mesures de fluctuation
 - a- Différences de fluctuations entre bille libre puis attachée

- b- Régime linéaire
- c- Etude des comportements de PSD entre bille libre puis attachée
- d- Etude de PSD de billes libres
- e- Caractérisation des fluctuations de billes attachées
- f- Et sur l'axe y ?

8) Conclusion sur les effets physiques observés

- a- A basses fréquences
- b- A hautes fréquences

9) Polymérisation et tube de membrane

10) Discussion

Dans ce chapitre, je vais d'abord décrire le dispositif sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse. Son montage a été initié par J. Lemièrre et T. Betz, je l'ai complété afin de mener ses premières expériences de tirage de tube, notamment en présence de la polymérisation d'actine. Ce dispositif est capable de contrôler en position et en intensité une pince optique. Je l'ai enrichi d'un module d'analyse du faisceau nous offrant d'excellentes résolutions temporelle (150 kHz) et spatiale (nm). J'aborderai ensuite notre stratégie de mesures de forces à haute résolution. Ces mesures ont révélé un comportement particulier jamais observé auparavant en ce qui concerne les fluctuations d'une bille piégée reliée à un liposome par un nano-tube de membrane. On étudiera ensuite la polymérisation d'actine au niveau d'un tel tube, afin de tenter de recréer *in vitro* les effets de la polymérisation d'actine sur l'endocytose.

1) Commande de la pince

Nous avons déjà observé précédemment (paragraphe II.2) le principe de fonctionnement d'une pince optique. Généralement, le piège est fixé au centre de la zone d'observation de la chambre, et c'est cette dernière qui est déplacée pour choisir l'objet à piéger [Yousafzai, 2016].

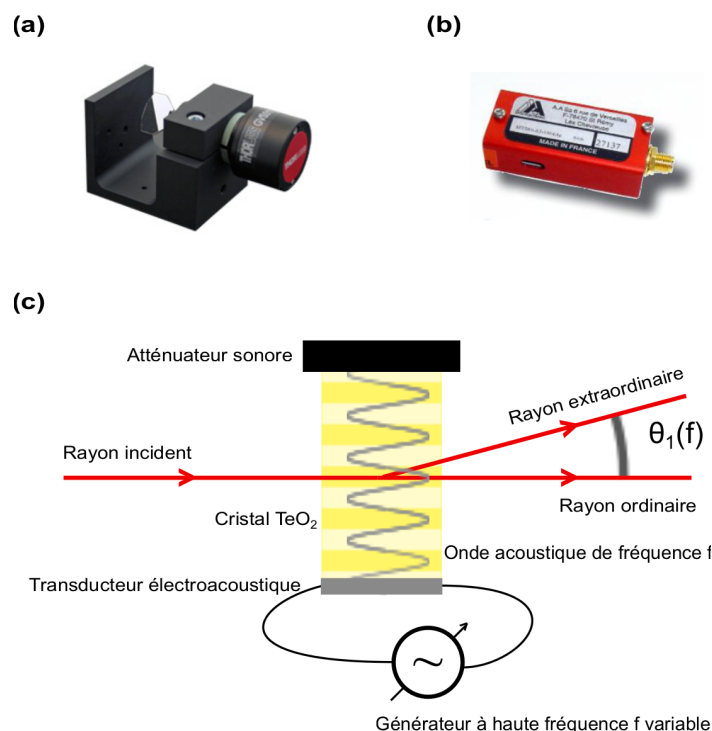


Figure 3.1 Quelques moyens de contrôle du déplacement d'une pince optique. **a** Miroir galvanométrique le moteur pas à pas est sur la droite de la monture. **b** Déflecteur AcoustoOptique AOD. La petite fenêtre sur la face avant correspond à la face avant du cristal de TeO₂. **c** Schéma de principe d'un AOD L'onde acoustique contrôlée en fréquence permet par interaction photon phonon la diffraction d'un rayon incident dans des directions principales connues.

Il s'avère très utile de pouvoir déplacer le point de focalisation du laser pour créer, par exemple, une multi-pince partagée en temps [Allioux-Guérin, 2009]. On peut alors piéger plusieurs objets simultanément, ou encore effectuer des balayages du faisceau laser sur les zones d'intérêt de la chambre, sans déplacer celle-ci. Dans notre cas, on souhaite pouvoir avoir des résolutions temporelles de l'ordre de la centaine de kHz afin d'accéder à des mesures de force plus précises. Nous avons donc opté pour un déplacement rapide du faisceau laser à l'origine de la pince optique. Je vais ici présenter brièvement certaines solutions expérimentales existantes pour permettre le déplacement rapide du faisceau piège : l'utilisation de miroirs galvanométriques, le principe de la pince optique holographique et enfin la solution qui a été retenue : l'emploi d'une paire d'amplificateurs acousto-optiques (AODs).

a) Miroirs galvanométriques

La méthode la plus simple à mettre en place expérimentalement, consiste à utiliser des miroirs galvanométriques (un exemple est donné sur la Fig 3.1.a, tiré de [Thorlabs, 2010]). Le dispositif est peu encombrant, et son alignement est le même que celui d'un miroir classique. Un miroir galvanométrique permet de contrôler l'inclinaison du faisceau en sortie du miroir en manipulant un moteur pas à pas. Cette approche a l'avantage de présenter peu de perte d'intensité, mais la présence de pièces mobiles engendre à la fois un temps de réponse assez important : 400 μ s de délai entre le signal de commande et la réponse (repositionnement) du miroir, et nécessite de régler régulièrement le centrage du faisceau. Un tel laps de temps ne pourrait pas convenir au balayage d'une bille mobile dans la chambre d'observation, celle-ci aurait en effet tout le loisir de se mouvoir au sein du piège. De plus cette technique à elle-seule ne permet pas la modulation en intensité du faisceau, ce qui fixe la constante de raideur k du piège optique (II.2) et empêche la vérification simple de la présence d'un tube de membrane (si l'intensité du faisceau baisse, alors la bille doit se décaler vers le liposome).

b) SLM

Le choix aurait également pu se porter sur un SLM (Modulateur Spatial de Lumière) à cristaux liquides pour utiliser le principe de l'holographie. Le SLM est un écran constitué de pixels indépendants et contrôlés par ordinateur, qui agissent sur la phase de l'onde qu'ils réfléchissent. En inscrivant sur l'écran du SLM un hologramme calculé numériquement, le laser ainsi diffracté peut avoir au premier ordre les caractéristiques d'un faisceau creux (dit de Laguerre-Gauss) et permettre la création simultanée de plusieurs faisceaux

(multiplexage). Mais cette technique occasionne de grosses pertes en intensité puisque seul le premier ordre est utilisé, et le temps de réponse est également assez important (de l'ordre de 1 ms d'après [Boulder Nonlinear Systems, 2016 ; Meadowlark Optics, 2016]).

c) Amplificateur acousto-optique (ou AOD)

L'utilisation d'une paire d'AOD (Fig 3.1.b, tiré de [AAOpto-Electronics, 2016]) pour pouvoir déplacer le piège optique selon x et y dans le plan d'observation à z fixé, a été déterminée par le temps de réponse ultra rapide (160 ns) de ce type de composant. Ce temps correspond en fait au temps de propagation d'une onde acoustique de fréquence f choisie (autour de 80 MHz) dans le cristal de l'AOD.

Cette onde sonore vient perturber l'organisation du cristal (Fig 3.1.c), ce qui entraîne la diffraction, par interférences constructives, du faisceau laser incident dans certaines directions privilégiées. Ce sont les directions de Bragg [Bragg, 1913] dont les angles $\theta_n(f)$ sont donnés par l'Eq 3.1 où n est l'ordre de diffraction, λ est la longueur d'onde du faisceau laser incident (1064 nm dans notre cas), et v la célérité de l'onde acoustique dans le cristal de TeO_2 (4200 m.s⁻¹).

$$\theta_n(f) = \frac{n \lambda f}{v} \quad \text{Eq 3.1}$$

Pour la suite du montage, on ne souhaite garder que l'onde diffusée du premier ordre θ_1 puisque son inclinaison est la plus finement contrôlée par $1 \times f$, la fréquence de l'onde acoustique choisie par l'expérimentateur. Ne conserver que ce rayon extraordinaire engendre donc beaucoup de perte d'intensité (près de 80% dans notre montage), mais le délai de 160 ns entre la commande et le changement d'angle effectif du faisceau permet un déplacement très rapide du piège optique. Ce déplacement est en outre très fin puisque le mouvement minimal du piège est inférieur au nm dans le plan d'observation (mesure faite en modifiant f tout en observant les mouvements d'une bille piégée).

Pour pouvoir ajuster la position du piège selon deux directions, on place un second AOD orienté perpendiculairement par rapport au premier. Les fréquences choisies pour chacun des AODs aboutissent ainsi à un déplacement effectif du piège dans le plan d'observation (en x et en y).

2) Montage initial

Lorsque je suis arrivé en thèse, Joël Lemière, Matthias Bussonnier (alors thésards) et Timo Betz (permanent CNRS), avaient déjà réalisé un montage optique complexe, schématisé Fig 3.2, permettant de créer une pince optique pouvant être contrôlée par des Amplificateurs Acousto-Optiques (AOD) sur un microscope confocal spinning disk (CSUX1 Yokogawa, Andor Technology, Irlande). L'emploi d'un microscope confocal spinning disk (ou disque tournant), a l'avantage de réaliser des images à très faible profondeur de champ, en illuminant le moins possible l'échantillon, ce qui évite le photo-blanchiment.

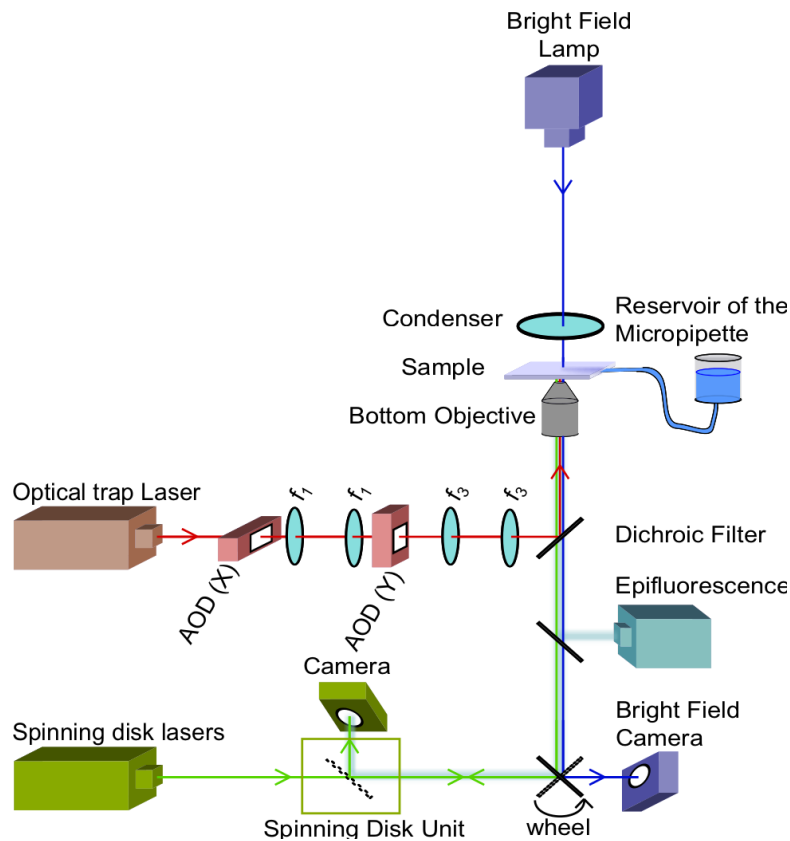


Figure 3.2 Schéma du montage expérimental initial. Le laser de la pince optique (en rouge) est contrôlé par la paire d'AODs. Les chemins des lasers du spinning disk, de l'épifluorescence, et de la lumière blanche sont représentés respectivement en vert, en turquoise et en bleu.

On reconnaît en dessous de l'échantillon (Fig 3.2) la partie commande du piège optique, avec la paire d'AODs permettant de diriger la pince dans les deux directions du plan d'observation. Les télescopes (f_1 - f_1 , f_3 - f_3) qui suivent chacun des AODs, servent à séparer sur une distance plus courte le faisceau de diffraction au premier ordre des autres diffractions.

La prise d'images est effectuée à l'aide de deux caméras. Celle qui recueille la lumière blanche « Bright field camera » (DCC 1545 M-GL, Thorlabs, Germany), et surtout la caméra (sCMOS Neo, Andor, Ireland) couplée au module confocal/spinning disk (CSUX1 Yokogawa, Andor, Ireland) qui peut prendre les images de fluorescence (vert, rouge et rouge lointain), ainsi qu'en épifluorescence (lampe à mercure).

Toute la partie en amont de l'échantillon (en dessous de l'échantillon sur la Fig 3.2) était donc opérationnelle au début de ma thèse. L'utilisation d'une caméra, dans les expériences de mesure de force pour détecter la position de la bille piégée, limite fortement la vitesse d'acquisition des données (100 Hz). Pour conserver la bonne résolution temporelle de la partie commande du faisceau obtenue avec les AODs, j'ai mis en place un système de détection par une PhotoDiode quatre Quadrants (QPD).

3) Détection par diode quatre quadrants (QPD):

Afin de préserver la bonne résolution temporelle de la commande du piège satisfaite par le couple d'AODs, nous avons opté pour un système de détection par diode quatre quadrants plutôt qu'un système de suivi vidéo. Cette méthode permet des mesures à des fréquences plus élevées (150 kHz vs 100 Hz), mais elle permet surtout un traitement informatique des données plus immédiat, lorsque le suivi vidéo nécessite une analyse *a posteriori* [Neuman, 2004]. C'est en effet la position relative de la bille par rapport au centre du piège qu'il est utile de connaître pour aboutir à une mesure de force de type rappel de ressort (II.2). Avant d'explicitier la mise en place de cette partie 'analyse' du faisceau sur le montage de la Fig 3.2, on va s'intéresser à l'utilisation de la QPD dans notre installation.

a) Technique du plan focal image

En utilisant une QPD, on n'a plus accès à l'image complète de la zone d'observation, contrairement à la caméra, mais simplement à l'intensité du faisceau laser qui l'illumine, ainsi qu'à la répartition de cette intensité sur quatre quadrants. La QPD traduit les intensités lumineuses arrivant sur chacun de ses quadrants en intensités électriques par effet photoélectrique, puis les convertit en tensions V_1, V_2, V_3, V_4 . Dans notre montage, ces informations sont traduites en une seule mesure de tension, puisque pour la suite des expériences, on souhaite mesurer les forces exercées sur la bille selon l'axe x. On la note V_{QPD} définie dans l'Eq 3.2.

$$V_{QPD} = \frac{V_1 + V_4 - (V_2 + V_3)}{V_1 + V_1 + V_3 + V_4} \quad Eq 3.2$$

V_{QPD} a été choisi comme étant la différence de tension entre les deux demi-quadrants selon x, divisée par la tension provenant de l'ensemble des quadrants pour normaliser le signal obtenu, ce qui permet de s'affranchir des variations d'intensités du faisceau laser. Un faisceau parfaitement centré sur la QPD donne ainsi $V_{QPD} = 0$.

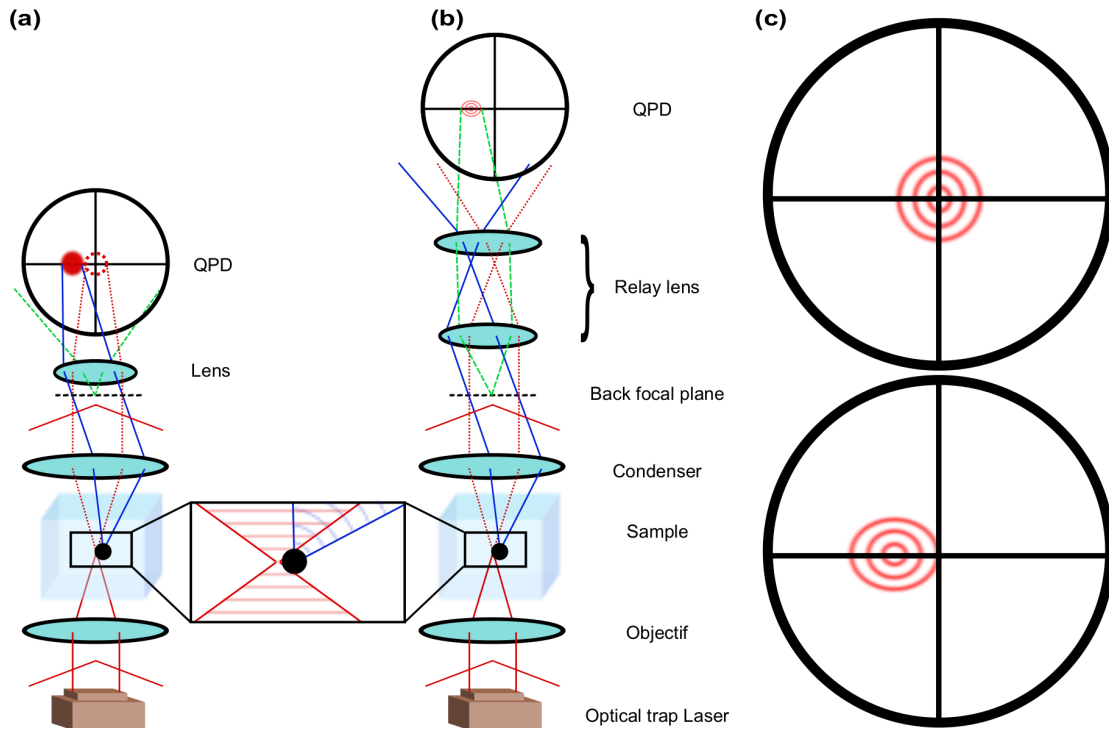


Figure 3.3 Schémas de principe de la technique du plan focal image. a Montage type d'image de la bille avec une QPD. Observation de la position absolue de la bille. **b Montage utilisant la technique du plan focal image.** L'image sur la QPD est celle du plan focal image du condenseur. Observation de la distance relative entre le centre de la bille et le centre du piège. **a-b** Les rayons diffusés par la bille sont en traits bleus pleins, ceux non déviés en pointillés rouges. L'insert représente les plans d'onde des faisceaux déviés et non déviés. Leurs interférences sont représentées en lignes vertes discontinues. **c Figure d'interférence sur la photodiode,** quand la bille est au centre du piège (haut) et à côté (bas).

On peut utiliser la QPD pour faire l'image de la bille sur la QPD comme présenté Fig 3.3.a. Dans ce cas, la position du spot sur la QPD variera avec la position absolue de la bille.

Pour obtenir directement la distance relative entre le centre du piège et le centre de la bille, l'utilisation de la QPD permet de se servir de la technique du plan focal image ('back focal plane technique') [Gittes, 1998]. Il s'agit de ne plus faire l'image de la bille contenue dans le plan d'observation sur la QPD,

mais plutôt de conjuguer le plan focal image du condenseur avec le détecteur de la QPD, comme schématisé Fig 3.3.b. C'est en effet dans ce plan que les rayons issus de la bille (onde sphérique) et que les rayons non déviés (onde quasi plane) vont interférer entre eux. Ces interférences (en vert) peuvent être alors localisées sur la QPD et ajustées en taille avec un télescope (relay lens). La figure d'interférence résultante que l'on peut observer dans un plan à z fixé est constituée d'anneaux concentriques quand la bille est bien au centre du piège Fig 3.3.c (haut). Elle s'étire et se décale progressivement à mesure que la bille se déporte du centre piège optique Fig 3.3.c (bas). Ce décalage de spot sur la QPD ne dépend que de la distance relative entre le centre de la bille et le centre du piège optique [Gittes, 1998 ; Tolić-Norrellykke, 2006]. On peut alors utiliser directement, si la QPD est calibrée, la formule de la force de rappel d'un ressort pour connaître la force exercée sur la bille.

b) Calibration de la QPD

La figure d'interférence captée par la QPD va engendrer un signal de tension V_{QPD} qui ne dépend donc, d'après le montage utilisé Fig 3.3.b, que de la distance d entre le centre de la bille et le centre du piège. Pour se servir de la QPD pour connaître directement cette distance d , il faut étalonner $V_{QPD}(d)$, c'est-à-dire faire varier d tout en mesurant V_{QPD} . Sur un intervalle où $V_{QPD}(d)$ est bijective, en connaissant V_{QPD} , on pourra alors remonter jusqu'à d .

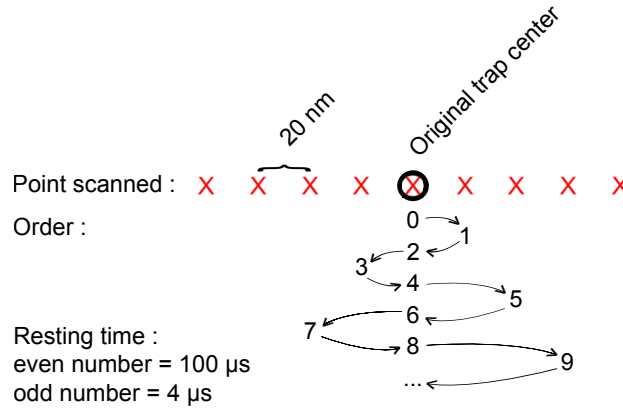


Figure 3.4 Schéma de balayage du laser pour la calibration de la pince. Le trajet de la pince optique est représenté par les différents arrêts effectués. Le laser est éteint pendant les phases de déplacement.

Dans la littérature, il est d'usage de se servir d'une bille collée au fond d'une chambre [Neuman, 2004] pour faire varier d : en déplaçant la bille fixée au fond de la chambre dans un piège optique immobile par un mouvement de la platine du microscope par exemple [Brouhard, 2003] ou encore en balayant la bille immobile par le faisceau laser du piège [Spudich, 2011]. Mais cette

technique suppose que la calibration ne dépend pas de la hauteur du plan d'observation dans la chambre (ce qui est faux [Pralle, 1999]), et fait l'hypothèse que la calibration est indépendante de la bille choisie (expérimentalement, on observe que chaque calibration est différente). L'idée [Turlier, 2016] de Timo Betz est de se servir de la très bonne résolution temporelle de la partie commande du piège obtenue avec les AODs (décrits au III.1.c) pour imposer d en déplaçant si rapidement le piège que la bille n'a pas le temps de se déplacer. On vérifiera cette hypothèse *a posteriori*.

Concrètement, la pince optique va suivre le balayage 'smart scan' décrit dans la Fig 3.4. D'une position originelle x_0 , tenue pendant 100 μ s pour s'assurer que la bille soit bien au centre du piège, le faisceau est déplacé en changeant la fréquence aux bornes de l'AOD, pour atteindre une distance d choisie. La QPD va pouvoir alors mesurer $V_{QPD}(d)$ pendant 4 μ s. La pince retourne ensuite en x_0 d'où elle repartira à une distance $-d$, pour effectuer un balayage symétrique, et ainsi de suite jusqu'à avoir enregistré $V_{QPD}(d)$ sur une zone de 8 μ m centrée sur la bille (3.05 μ m de diamètre), avec un pas de 20 nm. On obtient alors la Fig 3.5 en quelques secondes.

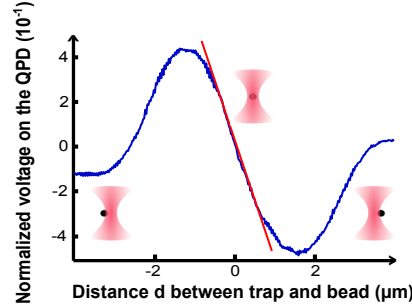


Figure 3.5 Calibration de la QPD. La courbe bleue est obtenue en déplaçant rapidement le laser, la bille restant immobile. La droite rouge est ajustée sur le régime linéaire.

Pour s'assurer de la validité de cette calibration, il faut prouver que la bille n'a pas eu le temps de se déplacer pendant les 4 μ s nécessaires à la mesure par la QPD. En considérant uniquement la force de rappel du piège ainsi que la force de frottement visqueux (Stokes), l'écart entre le centre de la bille et le centre du piège d est soumis à l'équation Eq 3.3, où m_{bille} est la masse de la bille, les autres quantités ayant déjà été introduites au II.2.

$$m_{bille} \ddot{d} = -6\pi\eta r_{bille} \dot{d} - k_{trap} d \quad Eq 3.3$$

En supprimant le régime de transition (c'est-à-dire en négligeant l'inertie de la bille), on obtient une solution en fonction du temps pour d donnée par Eq 3.4.

$$d(t) = d_{t_0} e^{\frac{-k_{trap}}{6\pi\eta r_{bille}} t} \quad Eq\ 3.4$$

Pour une valeur usuelle de constante de raideur du piège k_{trap} de l'ordre de 40 pN.µm⁻¹, et pour un temps de 4 µs, la valeur du terme exponentiel est de 0.994. Au maximum (pour $d_{t_0} = 4$ µm) la bille s'est donc déplacée vers le centre du piège de 13 nm. Si l'on regarde plus précisément la figure 3.5, on s'aperçoit que le régime linéaire (régime qui va nous intéresser pour avoir une correspondance simple entre $V_{QPD}(d)$ et d) ne s'étale pas sur plus de 1 µm, ce qui nous assure (en prenant $d_{t_0} = 0.5$ µm, le régime linéaire étant centré sur 0) que la bille n'a pas bougé de plus de 1.5 nm pendant la mesure. Ce que l'on négligera pour la suite. Le régime linéaire remarqué sur la Fig 3.5 permet d'établir une correspondance entre la tension mesurée aux bornes de la QPD et l'écart effectif entre le centre de la bille et le centre du piège. La calibration numérique de la QPD est décrite en annexe C.

Dans cette technique de calibration, on suppose que $V_{QPD}(d)$ (où d est obtenu en déplaçant le piège par rapport à la bille immobile en un point que l'on appellera origine), est identique au cas où d est mesuré en observant les déplacements de cette bille dans le piège optique centré sur cette origine.

En mettant en pratique la technique consistant à imager le plan focal image du condenseur sur la QPD dans notre montage, et grâce à la méthode de calibration sur bille libre (non adhérente à la surface de la chambre d'observation), il est désormais possible d'utiliser les mesures fournies par la QPD pour connaître précisément la position relative du centre de la bille par rapport au piège.

4) Vérifications et amélioration du dispositif

A l'issue des premières mesures de calibration, il est apparu que notre système ne se comportait pas comme attendu : distribution des positions de la bille libre dans le piège non gaussienne, densité spectrale de puissance (PSD définie au II.2) non cohérente (pas de régime visqueux) à hautes fréquences et grande variabilité des grandeurs mesurées au cours des expériences. Ces différentes imperfections ont abouti à plusieurs modifications du montage optique que je vais ici détailler.

a) Distribution de positions

Une bille maintenue dans un piège optique obtenu à l'aide de la focalisation d'un faisceau laser gaussien (mode TEM00) doit ressentir un potentiel harmonique. La densité de probabilité $P(d)$ de trouver un objet dans le puits de potentiel $U(d)$ à une certaine position d doit donc être décrite par la statistique de Boltzmann.

$$P(d) = \frac{1}{Z} e^{\frac{-U(d)}{k_B T}} \quad \text{Eq 3.5}$$

Avec Z la fonction de partition, k_B la constante de Boltzmann et T la température. La force exercée par le piège sur la bille étant une force de rappel, k_{trap} symbolisant la constante de raideur, on peut écrire le potentiel de la manière suivante.

$$U(d) = \frac{1}{2} k_{trap} d^2 \quad \text{Eq 3.6}$$

Et on retrouve, en injectant cette expression dans l'Eq 3.5, une distribution de probabilités ayant la forme d'une Gaussienne.

$$P(d) \propto e^{\frac{-k_{trap} d^2}{2 k_B T}} \quad \text{Eq 3.7}$$

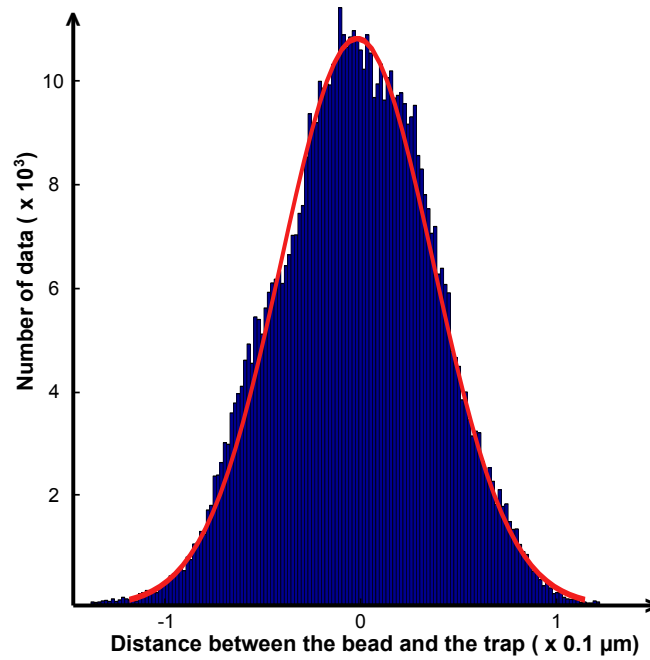


Figure 3.6 Distribution des positions relatives d'une bille piégée, mesurée à partir de la QPD, pendant 10 secondes. La gaussienne (en rouge) a été tracée à partir des 200 barres obtenues en moyennant les mesures faites à 250 kHz.

Cette équation implique notamment que la distribution des positions relatives du centre de la bille doit suivre une Gaussienne centrée en 0, la bille étant en moyenne au centre du piège.

En enregistrant la position relative d'une bille libre piégée au cours du temps, à partir des tensions mesurées par la QPD, on peut tracer la distribution des positions, représentée sur la Fig 3.6. Cette distribution s'écarte beaucoup de celle, Gaussienne, prédite à l'Eq 3.7, représentée par la courbe rouge. Si les positions mesurées sont en moyennes à $d = 0$, la mesure est assez bruitée, et peut être améliorée, comme on le verra Fig 3.13.

b) Diminution du bruit

Pour améliorer le signal délivré par la QPD, on a cherché à augmenter l'intensité du faisceau laser arrivant sur la QPD. On a d'abord multiplié par 2.5 la puissance du faisceau laser initial. En travaillant avec un faisceau de 5 W au lieu de 2 W, ce qui est à la limite supportable (au delà, on risquerait d'endommager les revêtements des optiques) pour les éléments en début de ligne comme les AODs ou les miroirs, on a pu s'apercevoir que l'on ne retrouvait pas ce facteur multiplicatif sur la QPD en mesurant $V_1 + V_1 + V_3 + V_4$. Cela s'est expliqué par la présence d'un condenseur à air (CLWD 0.72 Nikon, Japan), placé entre l'échantillon et la lumière blanche (Fig 3.2), à l'origine d'une grande perte d'intensité.

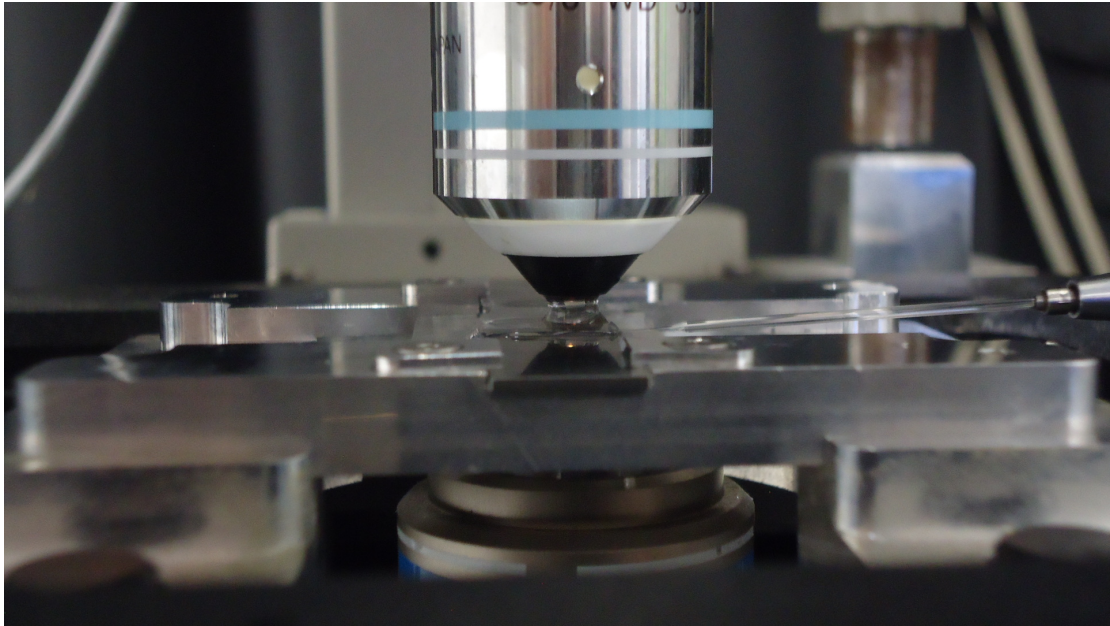


Figure 3.7 Photographie de la chambre d'observation (vue de côté). La micropipette à droite de l'image vient s'insérer entre les lames qui constituent les côtés de la chambre. Le 'top objectif' est ici en haut, et juste en dessous, on voit la colonne d'eau dont il faut prendre garde qu'elle-même ne se déverse dans la chambre.

Pour tenter de collecter davantage de faisceau laser sortant de la chambre d'observation, on a finalement opté pour un objectif (NIR APO 60x/0.80 W DIC N2 Nikon, Japan) à immersion à eau, que l'on appellera 'top objectif'.

Ce choix a rajouté deux contraintes assez fortes sur la chambre d'observation. D'une part son accessibilité s'est nettement réduite puisqu'elle est désormais 'prise en tenaille' entre les deux objectifs comme le montre la Fig 3.7. D'autre part, la largeur de la lamelle du dessus de la chambre étant fixée par les caractéristiques des micropipettes utilisées (longueur, inclinaison et paramètres d'étirement), la zone observable dans la chambre se trouve plus limitée. De plus, il faut éviter que la colonne d'eau liant le dessus de la chambre au top objectif entre en contact avec l'un des bords de la chambre. Cela entraînerait immédiatement un flux d'eau à pH et osmolarité incompatible avec les expériences en cours. Toutefois, ce top objectif, jouant le rôle d'un condenseur, a permis d'avoir une plus grande ouverture numérique (AN : 0.72 (ancien) $\rightarrow$ 1.0 (nouveau)), et en réduisant la distance de travail de 13 mm à 2.8 mm, la puissance transmise à la QPD a pu augmenter de 0.45 mW à près de 12 mW.

Le top objectif a donc rendu possible une puissance de faisceau plus importante pour la QPD, dépassant même la puissance limite pour ce composant et aboutissant à la saturation du courant délivré par la QPD. Pour atténuer l'intensité du faisceau, un polariseur jouant le rôle d'une densité optique (filtre) a été introduit sur le parcours du faisceau. Le passage à un objectif à immersion a aussi contribué à une focalisation plus importante du faisceau de lumière blanche, améliorant du même coup le contraste sur les images obtenues avec cette illumination.

Ces différents changements ont produit des résultats immédiats en terme de valeurs de tension délivrée par la QPD, mais n'ont eu aucun impact concernant la distribution des positions de la bille. Par contre l'augmentation du rapport signal sur bruit sur la QPD, résultant de l'utilisation du 'top objectif', a permis d'accéder à des mesures de PSD sur une plus large gamme de fréquences, ce qui a révélé une incohérence de notre système à hautes fréquences.

c) PSD et hautes fréquences

On a vu au paragraphe II.2 que le calcul de la densité spectrale de puissance (PSD) de la position relative de la bille dans un piège optique

permettait de mesurer la raideur du piège et devait avoir la forme d'une Lorentzienne. En particulier, la PSD théorique d'une bille piégée montre un régime plat à basse fréquence, indépendant de la fréquence de Fourier f considérée, et un régime à haute fréquence dépendant en f^{-2} . Le calcul explicite de la PSD de la position relative de la bille à partir des données de la QPD est détaillé dans l'annexe D.

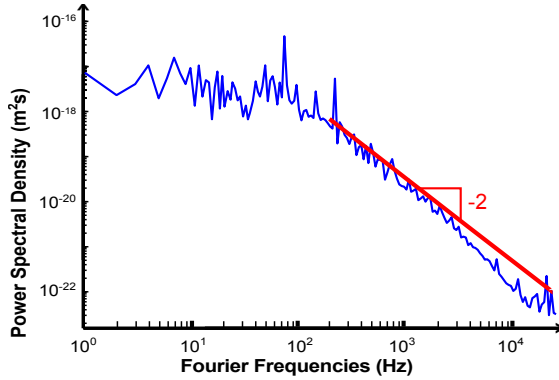


Figure 3.8 Densité Spectrale de Puissance (PSD) de la position relative de bille obtenue avec la QPD originelle. La représentation en échelle log-log permet d'afficher une droite symbolisant une dépendance en fréquence du type f^{-2} .

Expérimentalement, nous avons d'abord obtenu des résultats qui n'étaient pas en accord avec une lorentzienne. En effet, comme le montre la Fig 3.8, où une courbe de PSD expérimentale est tracée, si la partie basse fréquence est relativement plate, donc indépendante de f , la partie haute fréquence s'éloigne progressivement de la droite rouge symbolisant un exposant -2.

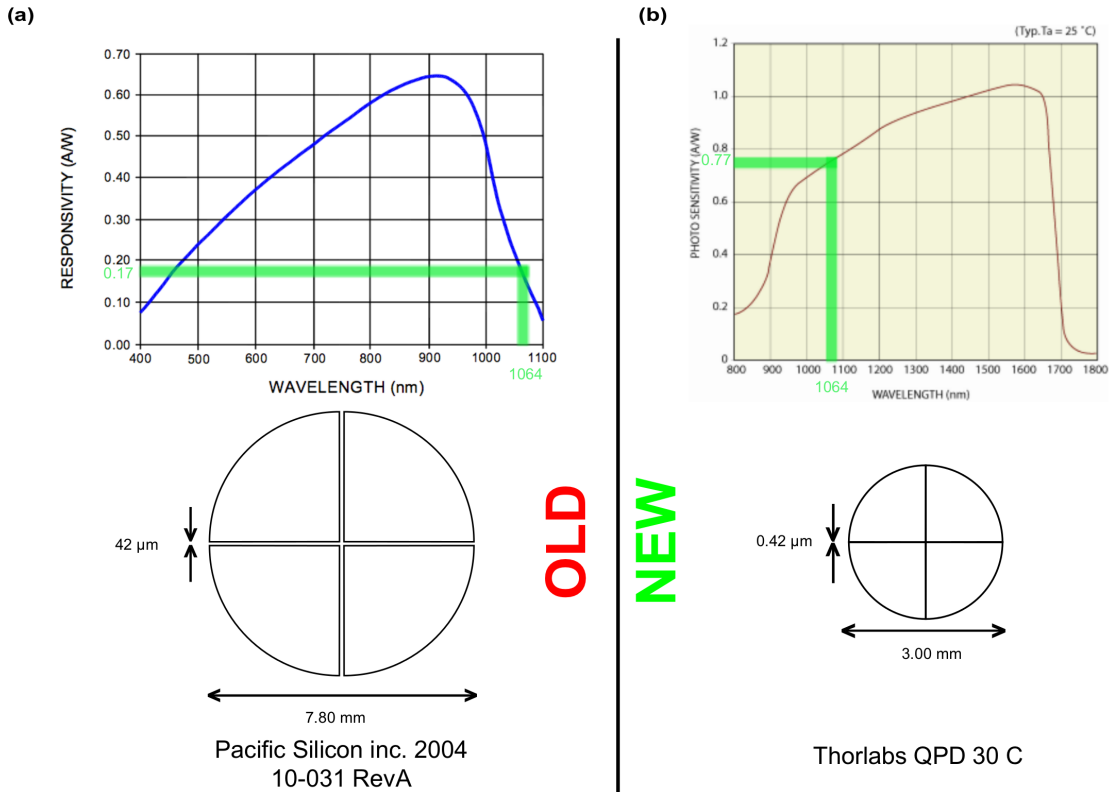


Figure 3.9 Comparatif entre la QPD originelle et la nouvelle. a-b En haut, photosensibilité des QPDs en fonction de la longueur d'onde. En bas, schéma du capteur pas à l'échelle.

Nous avons compris, après avoir plusieurs fois testé l'alignement des optiques, que ce défaut provenait de la QPD, trop peu sensible à la longueur d'onde de notre laser (1064 nm), et dont les quatre quadrants de détection du faisceau étaient espacés par de larges bandes aveugles de 42 μm Fig 3.9.a. Ce dernier élément nous obligeait notamment à conserver une taille de faisceau assez importante (3 mm) ce qui est toujours source de problèmes d'aberration : non seulement le volume focal est plus important, mais comme dans la calibration de la QPD, le faisceau est amené à être déplacé, cette déviation par rapport à l'axe optique nous éloigne des conditions de Gauss. Pour pallier à ce problème, nous avons décidé de changer de QPD (Fig 3.9).

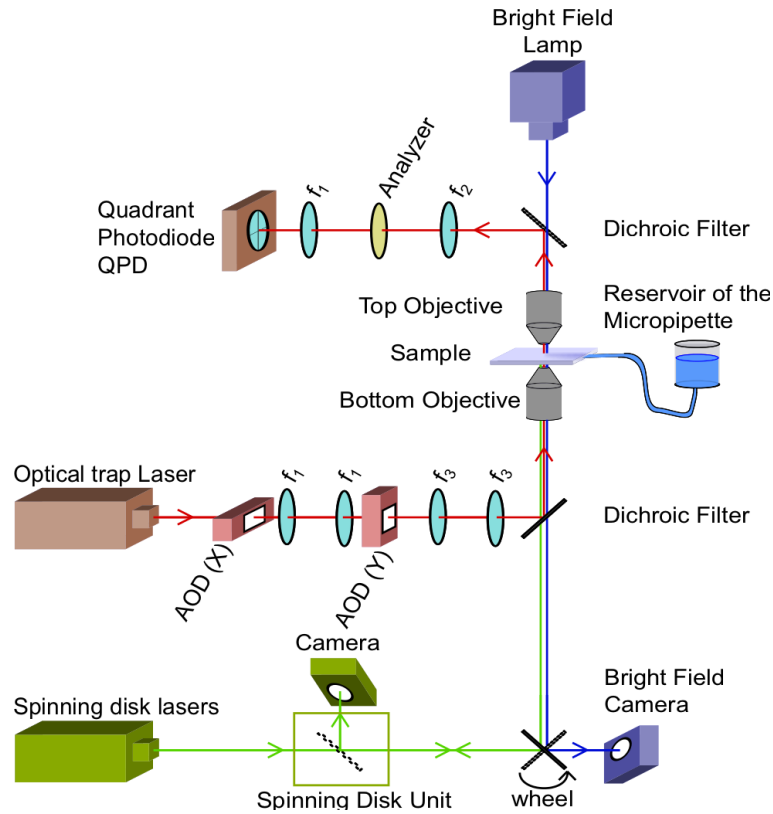


Figure 3.10 Set-up expérimental final. La partie en amont de l'échantillon pour le laser nécessaire au piège optique et à l'observation est restée inchangée. Les éléments en aval sont positionnés sur une table optique escamotable, pour pouvoir accéder à la chambre d'observation. Le laser y est dévié par un filtre dichroïque, qui a la propriété de laisser passer la lumière visible et d'être un miroir pour l'infrarouge (donc pour le laser).

Le passage à une QPD avec des bandes inter-quadrants plus fines de 0.42 μm Fig 3.9.b a permis de diviser la taille du faisceau par 3 (en changeant les focales du télescope relai) pour respecter les recommandations du constructeur [AAOpto-Electronics, 2016] du nouveau composant, et limiter les aberrations.

Tous ces changements (top objectif, nouvelle QPD, lentilles relai) ont abouti au set-up actuel présenté Fig 3.10, où la QPD se situe sur une

plateforme que l'on doit enlever / repositionner pour chaque expérience. Ces déplacements se sont vite traduits par un désalignement régulier des éléments, ce qui m'a conduit à réfléchir à une méthode d'alignement systématique rapide.

d) Alignement des optiques

Les petits chocs provoqués par les déplacements de la plateforme qui finissent par désaligner lentement les optiques sont inévitables, mais en plus, l'alignement de ces optiques est très complexe, surtout quand on regarde le nombre de degrés de libertés offerts par le montage Fig 3.11 qui schématise la Fig 3.12. J'ai peu à peu mis en place le protocole suivant, qui détaille, dans l'ordre, les différents réglages à effectuer pour optimiser l'alignement des optiques.

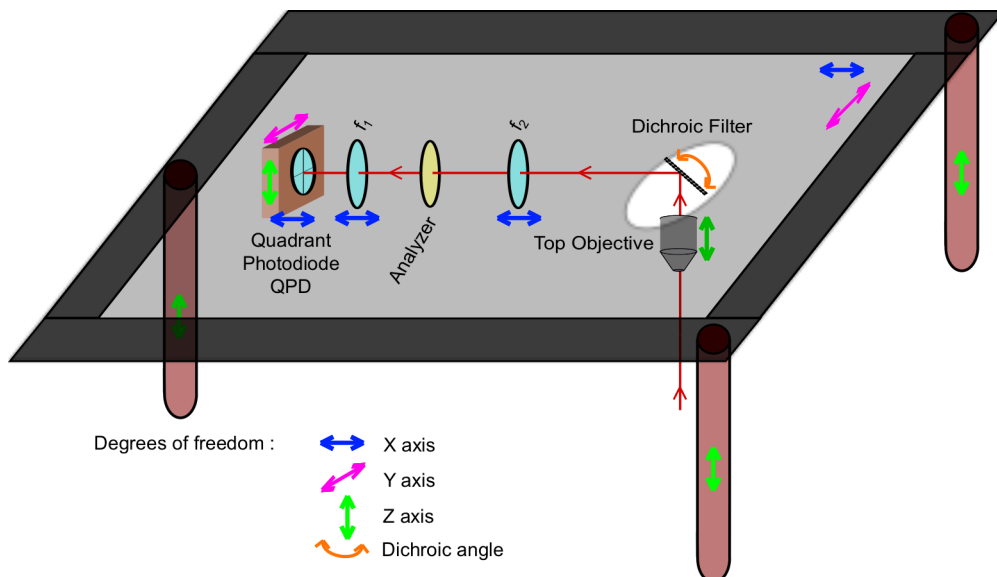


Figure 3.11 Schéma de la plateforme d'analyse du faisceau. Le faisceau laser est représenté en rouge. Les degrés de liberté de réglage de chacun des éléments d'optique sont indiqués par les flèches détaillées dans la légende.

1- Pieds de la table

La plateforme est montée sur des pieds de hauteur ajustable, ce qui introduit une inclinaison. Cette inclinaison ne peut être compensée ailleurs dans le dispositif et cela conduit à rendre les déviations du faisceau selon x dépendante des déviations selon y (et réciproquement), ce qui brouille la lecture des indications sur la QPD. On fixe donc la hauteur de chacun des trois pieds à l'aide d'un niveau à bulle, de manière à ce que la plateforme soit parallèle à la table optique. L'absence d'inclinaison de la plateforme peut être vérifiée *a posteriori*, une fois tous les autres réglages effectués, par le fait que le

déplacement du piège selon un x (ou y) n'entraîne pas de modification de détection de la QPD sur y (ou x). On matérialise ce réglage par un trait d'alignement (trait rouge scotch jaune que l'on peut voir sur la Fig 3.12 tout à droite) pour y revenir plus facilement.

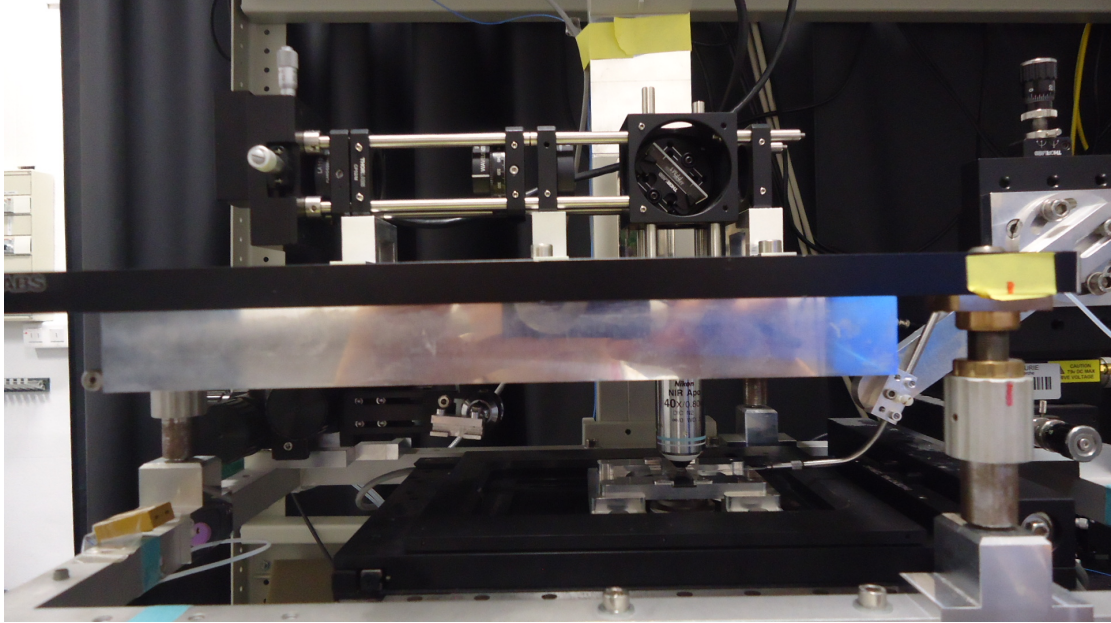


Figure 3.12 Photographie de la plateforme d'analyse du faisceau. En plus des éléments déjà décrits précédemment comme la micropipette à droite s'insérant au centre d'une chambre d'observation, on observe la plateforme à trois pieds, sur laquelle est disposée la partie analyse du faisceau. La QPD étant tout à gauche.

2- Plateforme

Ce réglage consiste à aligner l'axe optique du top objectif avec l'objectif du dessous. Pour cela, on s'assure que la lumière blanche venant du haut du montage (Fig 3.10), et traversant le filtre dichroïque (transparent pour la lumière visible) illumine correctement la zone d'observation. En réduisant l'éclairage à un mince filet de lumière, tout en maintenant celui-ci dans le plan d'observation, on peut déplacer la plateforme sur (x,y) jusqu'à ce que les deux objectifs partagent le même axe optique.

3- Top objectif

Pour respecter le schéma Fig 3.3, et utiliser la technique du plan focal image, il faut que le plan d'observation (là où se situe le piège optique) soit au foyer objet du top objectif. Classiquement, on fait l'image du diaphragme de champ sur l'illumination en transmission au niveau de l'échantillon. Toutefois, l'accès au réglage du top objectif nécessite d'être debout, et les doigts de l'expérimentateur devant se frayer un chemin entre la plateforme montrée Fig

3.12 et l'échantillon, le réglage ne peut se faire à l'aveugle (sans regarder). C'est pour cela que l'on règle la distance entre cet objectif et le dessus de l'échantillon en vérifiant que le faisceau laser est focalisé à l'infini après le top objectif. Cet ajustement est facilité par le dichroïque que l'on peut tourner sur son axe afin de disposer de plus de place pour vérifier l'absence de focalisation du laser.

4- Dichroïque

L'inclinaison du dichroïque est ensuite déterminée en faisant arriver le faisceau laser au centre de la première lentille du télescope. Pour éviter de refaire régulièrement ce dernier ajustement en utilisant un iris couplé à un puissance mètre, ce qui n'est pas évident expérimentalement à cause de l'encombrement des différentes pièces, j'ai utilisé la partie de la lumière blanche réfléchie par le dichroïque. Cette partie non utilisée finit sa course contre un mur. L'inclinaison correcte du dichroïque correspond pour la lumière blanche à un endroit bien précis sur ce mur. Un repère (scotch jaune) marque cet endroit afin d'incliner le dichroïque plus rapidement du bon angle.

5- Lentilles et QPD

En utilisant le 'caged system' développé par Thorlabs, qui consiste à lier par des barreaux métalliques (visibles sur la Fig 3.12) les différentes montures des éléments d'optiques, je n'ai pas eu à me soucier de l'alignement des différents éléments de la table selon un même axe optique, celui-ci étant commun à l'ensemble des optiques 'en cage'. Le positionnement de la première lentille (f_2) est obtenu, après avoir retiré l'objectif du dessous ainsi que l'échantillon, en focalisant le faisceau laser à l'infini. La seconde lentille (f_1) est ajustée de manière à maximiser le signal reçu sur la QPD, placée au foyer image de cette dernière lentille. On évite la saturation du signal de la QPD grâce à un analyseur placé entre les lentilles, qui joue ici le rôle d'atténuateur.

Il nous reste maintenant à valider cette procédure et les différents changements que l'on a effectués sur le montage (nouvelle QPD, top objectif à immersion).

5) Validation du set-up

Vérifions que l'on retrouve après tous ces changements à la fois une distribution bien gaussienne des positions relatives de la bille libre, et aussi une partie haute fréquence pour la mesure de la densité spectrale de puissance (PSD) en accord avec la théorie exposée au II.2.

a) Distribution de positions

Si l'on effectue maintenant une mesure de la distribution des positions relatives d'une bille libre (non attachée à la surface de la chambre) piégée et que l'on compare à la mesure avant changement comme sur la Fig 3.13, on remarque d'abord un meilleur accord avec la Gaussienne, comme le prévoyait l'Eq 3.7. Les barres sont mieux ordonnées, et la courbe est plus fine. Cette baisse de l'écart-type σ de cette distribution est en réalité reliée à la constante de raideur du piège selon l'Eq 3.8.

$$\sigma^2 = \frac{k_B T}{k_{trap}} \quad Eq\ 3.8$$

En effet, il est connu qu'augmenter la puissance du laser 'pince' permet d'augmenter sa raideur [Afzal, 1992], et c'est ce que nous avons fait en passant de 2 à 5 W (III.4.a).

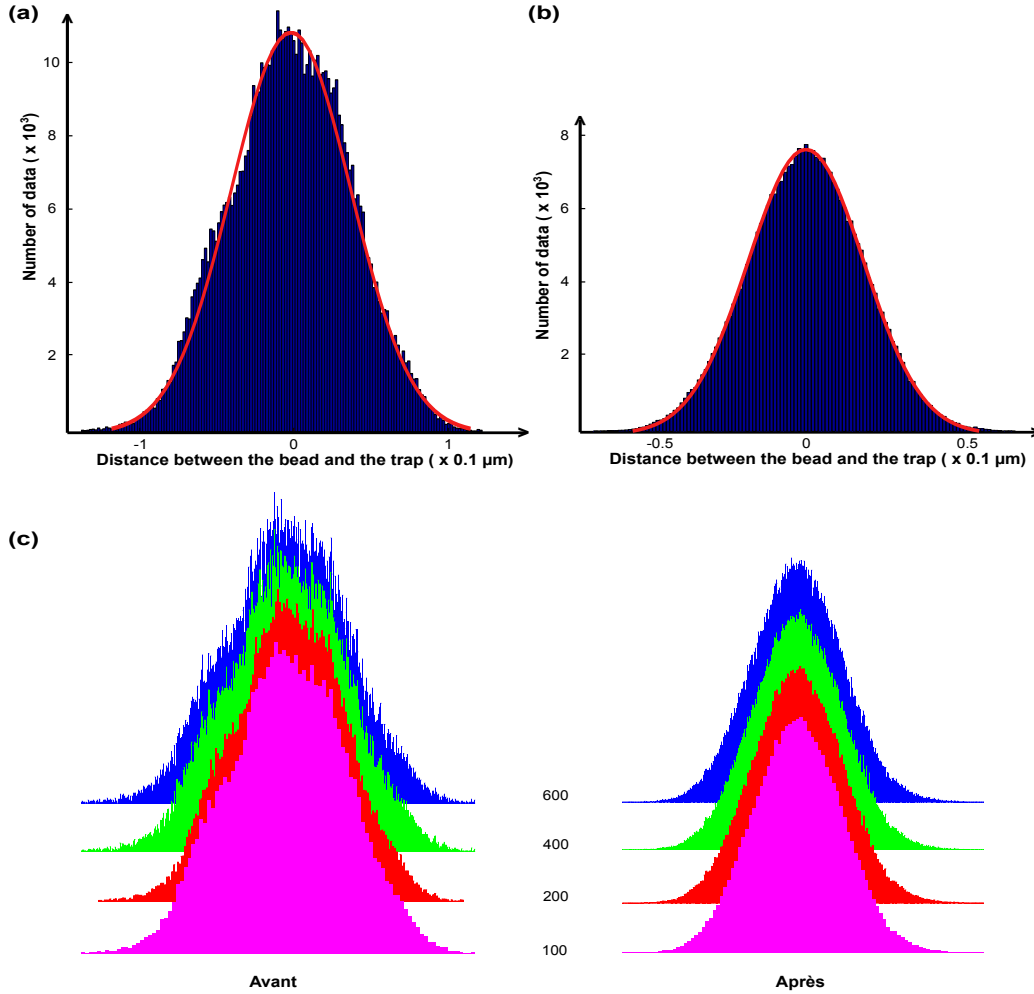


Figure 3.13 Distribution des positions relatives d'une bille piégée, a mesurée à partir de la QPD originelle, avant changement pendant 10 secondes **b** mesurée à partir de la nouvelle QPD, après changement pendant 5 secondes. Les deux gaussiennes (en rouge) ont été tracées à partir des 200 barres obtenues en moyennant les mesures faites au même taux d'acquisition (250 kHz) mais sur des temps différents. **c** Dessin de ces distributions en variant le nombre de barres de l'histogramme (de bas en haut 100, 200, 400, et 600 points).

L'allure de la courbe est plus aisément reconnaissable et ajustable par une Gaussienne, Gaussienne qui se révèle cette fois indépendante du nombre de points (barres de l'hitogramme) choisi pour la tracer. On a ainsi pu réduire la durée d'enregistrement à 5 secondes, ce qui réduit le temps de calibration.

b) PSD et hautes fréquences

Pour continuer les vérifications techniques du montage, il reste à vérifier que la PSD d'une bille libre piégée respecte bien les deux régimes identifiés au II.2, et plus particulièrement le régime à hautes fréquences qui doit montrer une dépendance en f^{-2} .

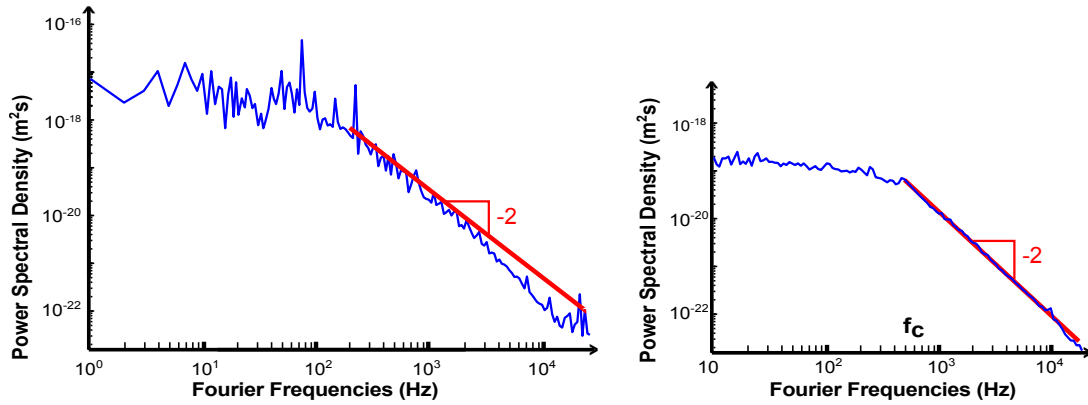


Figure 3.14 Densité Spectrale de Puissance (PSD) de la position relative de bille à droite obtenue avec la QPD originelle avant changement, et à gauche avec la nouvelle QPD après changements. La représentation en échelle log-log permet d'afficher une droite symbolisant une dépendance en fréquence du type f^{-2} .

La nouvelle PSD de la Fig 3.14 montre d'une part que le régime à hautes fréquences est bien celui attendu : la pente (en rouge) représentant l'exposant -2 est confondue avec la courbe. D'autre part on observe le décalage de la fréquence de coupure entre ces deux expériences, là encore à cause du changement de constante de raideur du piège (dû à l'augmentation de la puissance du laser d'entrée). C'est sur ce type de données que la constante de raideur du piège va être déterminée, en ajustant à la PSD traitée (cf annexe E) une Lorentzienne dont l'équation déjà étudiée au II.2 donne directement k_{trap} .

L'accord de ces mesures avec l'équation de Langevin clôt les vérifications techniques de la cohérence de notre montage expérimental. On va ainsi pouvoir mesurer des forces sur une bille, et en premier lieu, accéder au module de courbure κ de liposomes électroformés.

6) Mesures de module de courbure

On a introduit au I.2.c la notion de module de courbure κ d'un liposome comme étant l'énergie associée à un changement de courbure de sa membrane. On va ici chercher à le mesurer en utilisant la capacité de notre montage à mesurer les forces ($F = k_{trap} d$) s'exerçant sur une bille piégée, collée à un tube de membrane extrait d'un liposome (comme au II.2). D'abord, je vais décrire le déroulement d'une expérience type, puis l'analyse des résultats obtenus.

a) Protocole expérimental

Liposomes

Pour former un tube de membrane, on doit coller une bille piégée à un liposome et éloigner le centre du piège de la membrane. Pour réaliser cette interaction, on a choisi d'utiliser des lipides biotinylés dans la composition des liposomes électroformés (cf annexe B) pour que ceux-ci se lient avec la streptavidine qui recouvre la surface des billes.

Je n'ai pas utilisé de lipides fluorescents pour visualiser concrètement la présence d'un tube, plusieurs expériences réalisées par Joël Lemièrre et Kevin Carvahlo montrant l'incompatibilité de la polymérisation d'actine avec ce type de lipides. Ce point vient d'être résolu, et devrait permettre de nouvelles expériences bientôt. Pour pouvoir mesurer le rayon interne de la micropipette r_m et celui du liposome r_l , j'ai ajouté de la sulforhodamine B qui fluoresce dans le vert – 554 nm (Fig 3.15.a) dans la solution interne des liposomes. En améliorant ainsi le contraste global par rapport à la lumière blanche, on peut alors automatiser la mesure de ces rayons en recherchant les points d'inflexion dans l'intensité lumineuse d'un profil tracé le long d'un diamètre du liposome pour obtenir r_l ou perpendiculairement au tube pour estimer r_m (cf annexe F). On a vu, lors de la création du tube, que l'étape la plus coûteuse énergétiquement était de déformer la membrane sphérique du liposome. Afin de faciliter cette phase, une différence de 30 mOsm a été établie entre l'intérieur et l'extérieur (plus concentré donc) du liposome pour relâcher sa membrane.

Préparation de la micropipette

Les micropipettes sont issues de la transformation de capillaires en borosilicate (obtention de cônes longs à l'aide d'une étireuse, puis microforge du bout de l'extrémité la plus fine pour fixer le diamètre). Juste avant de les insérer dans la chambre, elles sont remplies d'une solution à 0.5 g.L⁻¹ de β -

caséine diluée dans de l'eau, pour éviter l'adhésion des liposomes lors de leur aspiration. Dans le montage, la micropipette est elle-même reliée à un réservoir d'eau réglable en hauteur (Fig 3.2), ce qui permet lorsqu'il n'y a aucune bulle d'air entre le bout de la micropipette et le réservoir, de choisir la pression d'aspiration. Dans le cas contraire, on observe un très lent équilibre des pressions (à cause de la compressibilité de la bulle d'air) qui ne permet pas par exemple d'effectuer correctement le 'zéro d'aspiration' : c'est-à-dire quand la micropipette n'introduit pas de flux dans la chambre.

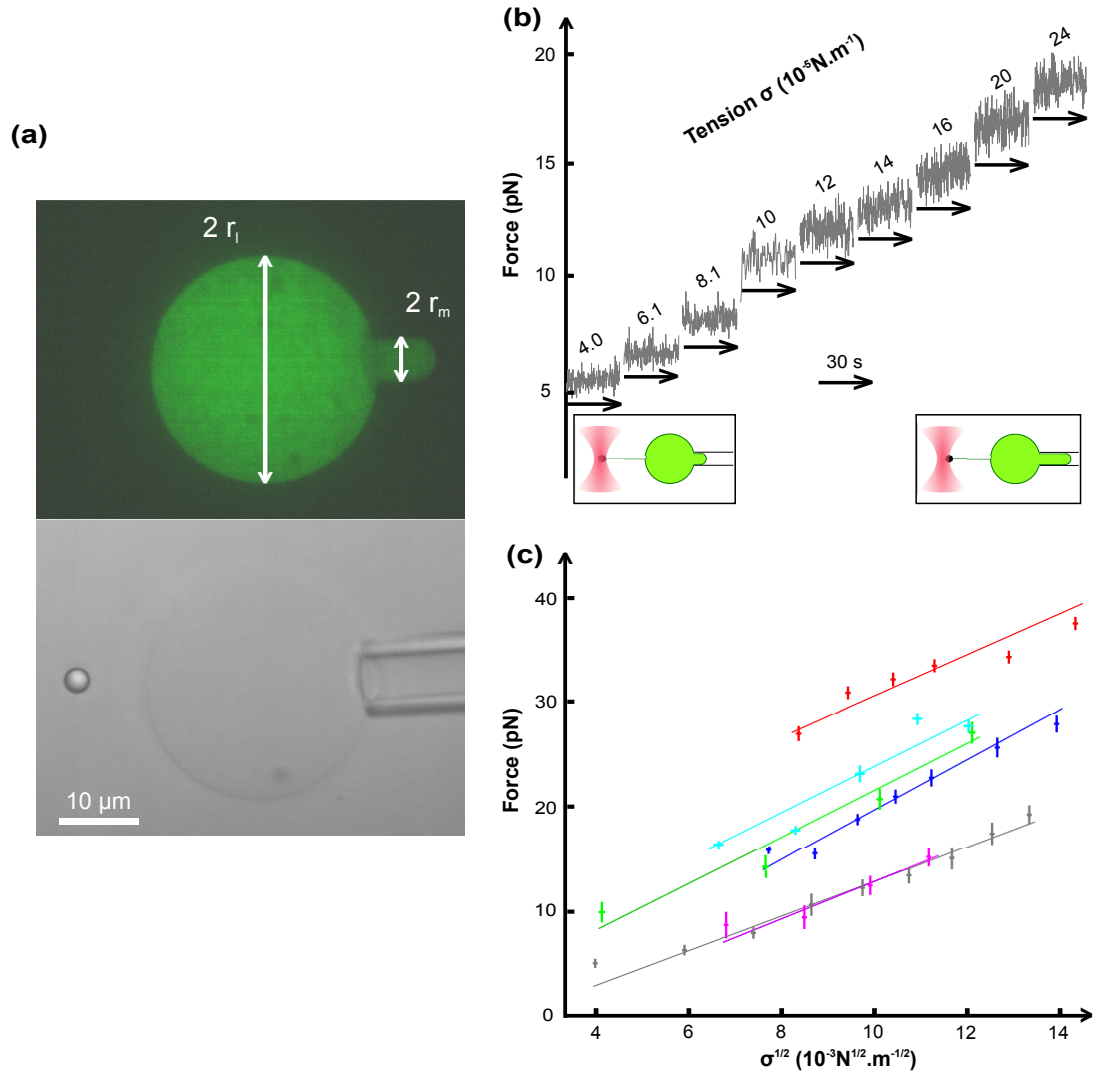


Figure 3.15 Expériences de mesure de module de courbure

a Liposome maintenu par une micropipette en champ clair (bas) et en fluorescence (haut). Ces images constituent les préparatifs à la mesure d'un module de courbure. On s'assure que la langue est assez grande pour utiliser la loi de Laplace. On place la bille dans l'axe de la micropipette. L'image en fluorescence permet de visualiser l'intérieur du liposome rempli de sulforhodamine B et rend possible la mesure des rayons du liposome et de la micropipette.

b Mesures de la force sur une bille dans une expérience de tirage de tube à différentes tensions. La force pour chaque incrément de tension est enregistrée pendant 30 s après 30 s d'attente consécutive au changement de tension.

c Mesures des forces en fonction de la racine carrée de la tension de membrane pour 6 différents liposomes. Les expériences ont été réalisées pour une raideur de piège de l'ordre de $(37 \pm 6) \text{ pN}.\mu\text{m}^{-1}$ avec une puissance de laser de 5W en entrée du dispositif, soit 80 mW au niveau de l'échantillon. Le coefficient directeur des droites ajustées sur les courbes donne alors accès au module de courbure.

Préparation de la chambre

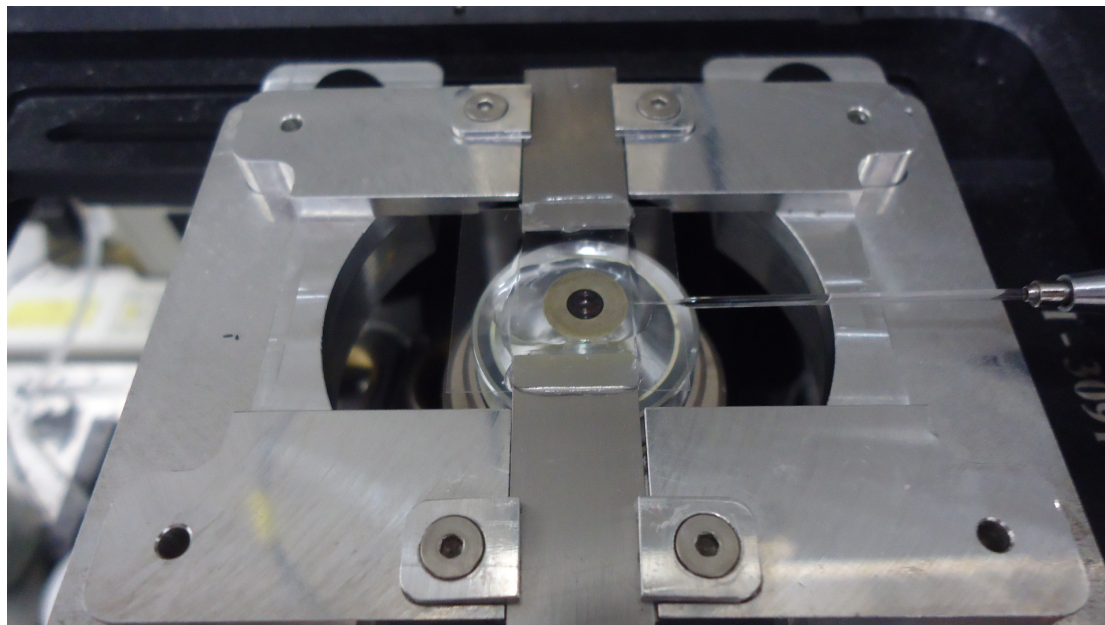


Figure 3.16 Photographie de la chambre d'observation (vue de haut). La micropipette (à droite) s'insère entre deux lamelles de verre constituant le dessus et le dessous de la chambre. Elles sont collées sur deux fines lames de métal.

La chambre d'observation (Fig 3.16) est constituée de deux fines lames de métal sur lesquelles sont collées avec de la graisse (High vacuum grease, Dow Corning, United States) deux lamelles de verre (0.13-0.16 mm, Menzel Gläze, Australia). La chambre doit être aussi passivée avant l'ajout des liposomes et des billes pour empêcher toute adhésion au fond de la chambre. On utilise pour cela de la β -caséine (à 5 g.L⁻¹) diluée dans de l'eau pour recouvrir les parois de la chambre. La micropipette est mise en place dans cette chambre pendant les 15 minutes d'incubation pour passiver sa surface extérieure.

On peut ensuite remplacer la solution de passivation par la solution extérieure des liposomes et y ajouter 1 μ L de billes streptavidinées (solution commerciale 0.5 % w/v 3.05 μ m de diamètre SpheroTech®, diluée 500 fois) et 10 μ L de la solution de liposomes après électroformation.

Les bords de la chambre doivent donc être ouverts, pour laisser passer la micropipette nécessaire au maintien du liposome à partir duquel on formera un nano-tube. Pour éviter l'évaporation de l'eau on termine la préparation de la chambre en plaçant sur les bords ouverts quelques gouttes d'huile minérale.

Formation du tube

D'abord, il faut choisir un liposome suffisamment gros pour négliger la variation de son rayon, engendrée par l'élongation de la langue, puis l'aspirer à l'aide de la micropipette pour que l'on puisse ajuster sa tension de membrane comme on l'a vu au I à travers des Eq 1.6-8 résumées ici.

$$\sigma = \frac{1}{2} \rho g |h| r_m \left(1 - \frac{r_m}{r_l}\right)^{-1} \quad \text{Eq 3.9}$$

Ensuite, on attrape une bille non adhérente au fond de la chambre à l'aide de la pince optique décrite au début de ce chapitre (il arrive que même avec la passivation, pour des temps d'expérience de l'ordre de quelques heures, des billes collent). Puis on élève cette bille à la hauteur de la micropipette dans son prolongement comme sur la Fig 3.16.a. Pour cette position (x,y,z) donnée, on effectue la calibration de la bille (mesure de $V_{QPD}(d)$, et PSD) libre dans le piège.

Finalement, sans déplacer la position du piège optique pour ne pas perdre la calibration de la bille, on approche le liposome en décalant la micropipette montée sur un support motorisé vers la bille jusqu'au contact. Puis on l'éloigne en espérant qu'un lipide biotinylé du liposome ait pu se lier à la streptavidine de la bille. Cette étape peut être répétée de nombreuses fois, en faisant varier les vitesses d'approche et le temps de contact, tant que la bille reste bien piégée. En effet, si la bille reste collée au liposome, il devient impossible sur notre montage d'extraire un nano-tube. Comme on ne peut pas voir le tube directement, on peut vérifier sa présence de deux façons simples : en diminuant l'intensité du piège, on observe le déplacement de la bille vers le liposome, ou alors en scrutant les déviations du faisceau laser sur la QPD, on doit avoir initialement (bille libre) $V_{QPD}(d = 0) = 0 V$ et dans le cas du tube (bille attachée) $V_{QPD}(d \neq 0) \neq 0 V$.

b) Résultats

Pour mesurer le module de courbure κ de liposomes, à partir de ce type de montage, on utilise la formule établie au II.2 (Eq 2.2 réécrite ci dessous) qui lie f_{tube} la force exercée par le tube sur la bille, à σ la tension de la membrane du liposome.

$$f_{tube} = 2\pi \sqrt{2 \kappa \sigma} \quad \text{Eq 2.2}$$

On peut alors mesurer à longueur de tube fixée, et à tension de membrane fixée, la force qui s'exerce sur la bille pendant 30 secondes (Fig 3.15.b). La tension d'aspiration est ensuite augmentée en abaissant le réservoir d'eau relié à la micropipette (Fig 3.10), en accord avec l'Eq 2.2. Un temps d'attente de 30 secondes est respecté pour éviter de mesurer des effets de relaxation transitoires de la tension. Et finalement une nouvelle série de mesures de forces peut être entamée toujours à la même longueur de tube, mais à une nouvelle valeur de tension. L'opération répétée neuf fois permet de tracer la courbe de la Fig 3.12.b. Les deux inserts rendent compte de l'augmentation de la tension de la membrane au cours de l'expérience. Cette augmentation se traduit à la fois par un déplacement de la bille dans le piège (c'est d'ailleurs ce qui permet la mesure de force), mais aussi par une augmentation de la taille de la langue d'aspiration.

Comme le précise la formule de l'Eq 2.2, c'est l'évolution de la force en fonction de la racine carrée de la tension qui nous renseigne sur le module de courbure. L'expérience renouvelée sur six liposomes différents permet d'obtenir la Fig 3.15.c sur laquelle on remarque que la force est bien proportionnelle à $\sigma^{1/2}$. On peut alors accéder au module de courbure de nos liposomes : $(8.6 \pm 2.4) k_B T$, en estimant ce coefficient de proportionnalité des droites obtenues, ce qui est conforme à la littérature ($10 k_B T$) [Petrache, 1998]. La prolongation de ces droites aboutit normalement à une force nulle lorsque l'on fait tendre la tension vers 0 N.m^{-1} . Cependant, il arrive que l'on s'en écarte lorsque le réglage d'absence de flux pour la micropipette a été modifié au cours de l'expérience, ce qui se produit quand on se déplace dans la chambre.

Notre système permet donc de mesurer les forces qui s'exercent sur une bille attachée à un tube de membrane (la calibration de la même bille libre ayant été faite auparavant). On respecte l'alignement pipette-tube-bille de manière à mesurer la totalité de la force exercée par le tube sur la bille. Par ailleurs, l'observation plus fine de la figure Fig 3.15.b semble suggérer une augmentation de l'amplitude des oscillations de la force avec l'augmentation de la tension. C'est la première fois que la résolution des mesures permet de telles observations, nous étudierons donc ces fluctuations dans la suite de ce chapitre.

7) Mesures de fluctuation

Dans un premier temps, on a cherché à savoir si en terme de fluctuations, on pouvait obtenir des différences entre le cas de la bille que l'on appellera 'libre', c'est-à-dire non attachée à un tube de membrane, mais piégée tout de même, et le cas de la bille dite 'attachée' (au tube de membrane),

également piégée dans la pince optique. On a ensuite voulu vérifier si il s'agissait bien d'un phénomène physique et non un effet lié à un artefact technique. Enfin j'ai pu observer ces fluctuations en faisant varier différents paramètres liés au tube.

a) Différences de fluctuations entre bille libre puis attachée

Notre montage permet de mesurer ces fluctuations sur la même bille, et donc de s'affranchir d'un artefact lié aux variations d'une bille à l'autre. Lorsqu'une même bille passe du statut libre à celui d'attaché, on peut sonder les différences entre les forces nécessaires au maintien d'un tube de membrane. Il est connu que ces forces vont écarter la bille du centre du piège. Ce phénomène nous a en effet permis précédemment d'en déduire les forces ressenties par la bille, et ce qui s'observe sur la Fig 3.17 par un changement de la moyenne de la distribution des positions relatives de la bille qui passe de 0 à 0.19 μm . On peut aussi observer un changement de forme de la distribution.

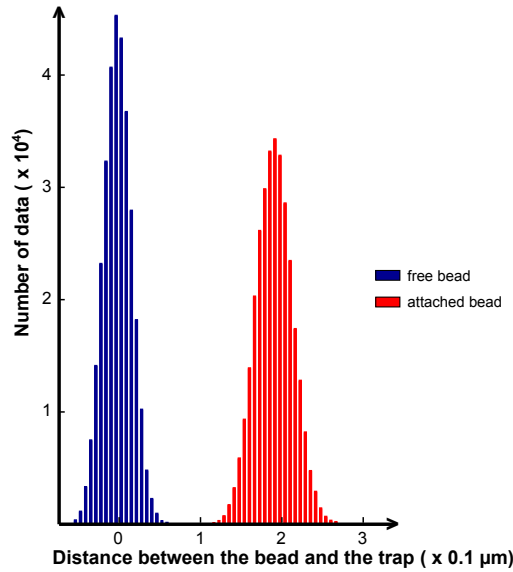


Figure 3.17 Distribution des positions relatives d'une bille libre (bleu) puis attachée (rouge). La valeur moyenne change, ce qui rend compte de la présence du tube qui applique donc une force sur la bille. La variation de l'écart-type est un peu plus subtile, mais tout aussi visuelle : sachant que ces deux distributions sont des gaussiennes (III.4.a), et que leurs aires sont identiques (même nombre de points) comme celle de gauche possède un pic plus élevé, c'est que son écart-type est moindre.

L'écart-type d'une telle distribution dans le cas d'une bille libre est lié à la constante de raideur du piège (cf Eq 3.8). Mais cette raideur ne devrait pas varier sur deux mesures effectuées sur la même bille. C'est donc qu'il y a un effet de la présence du tube sur les fluctuations de la position de la bille dans la chambre d'observation. On peut d'ailleurs mettre en évidence cette

augmentation d'écart-type en compilant les mesures effectués sur $N = 10$ billes libres puis attachées sur la Fig 3.18, ce qui prouve que cette différence d'écart-type visible Fig 3.17 est bien significative.

Ce résultat nous a semblé assez contre intuitif au départ, puisqu'on s'attendait plutôt à observer une baisse de l'amplitude du mouvement d'une bille attachée par rapport à une bille libre. Dans le cas libre, la force de rappel du piège est en effet inférieure au pN (vu que la bille est en moyenne au centre), tandis que dans le cas attaché, cette force est de l'ordre de 10 pN, ce qui tendrait à laisser penser que les fluctuations de positions seraient plus limitées. On a alors donc cherché à comprendre les causes de cet effet en vérifiant l'absence d'artefacts de mesure liés à la présence du tube.

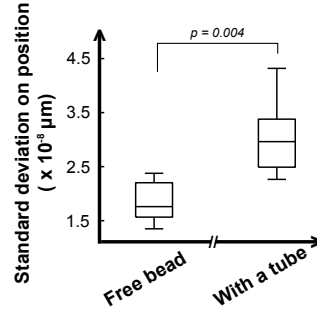


Figure 3.18 Mesure de l'écart-type de distributions de positions relatives de billes libres puis attachées ($N = 10$), pour une force mesurée de l'ordre de 14 ± 2 pN. Le test de p-value a été effectué sous Matlab.

b) Régime linéaire

Cette modification dans la distribution nous a d'abord interrogé sur la validité de la position relative obtenue par la QPD lors de la présence d'un tube. On a déjà explicité la calibration de la QPD (III.3.b), il nous faut ici vérifier que la bille reste effectivement dans le régime linéaire sur lequel on a une bijection entre V_{qpd} et d . Il faut aussi vérifier que le piège optique reste linéaire sur toute la gamme des tensions utilisées [Richardson, 2008].

Après avoir mesuré $V_{qpd}(d)$ (obtenu en déplaçant très vite le laser pour que la bille reste immobile), on peut ensuite mesurer la tension délivrée par la QPD lorsque le piège est maintenu fixe, la bille étant laissé libre dans le piège. Ces tensions vont correspondre sur la Fig 3.19 à des positions atteintes par la bille lors de son mouvement. Si on repère ces positions par une barre verticale, d'épaisseur recouvrant toutes ces positions atteintes, on observe que dans le cas

de la bille libre (Fig 3.19.a) cette zone est entièrement comprise dans le régime linéaire où courbe de calibration et ajustement linéaire (en rouge) se confondent.

La question est désormais de savoir si, une fois attachée à un tube de membrane, la bille restera dans ce régime linéaire. En remesurant des courbes de calibration de QPD en situation attachée (Fig 3.19.b-c), on s'est d'abord aperçu que la courbe $V_{qpd}(d)$ était modifiée. D'une part, les courbes sont globalement translatées vers la gauche, ce qui était attendu puisque la bille (immobile lors du scan) n'est plus au centre du piège (donc en $d = 0$) mais plutôt en $d > 0$. Les courbes subissent également d'autres modifications d'autant plus importantes que l'on s'éloigne du centre du point de mesure. Il faut voir dans ces modifications le fait que la bille attachée s'est probablement déplacée sur l'axe z à cause de la présence du tube.

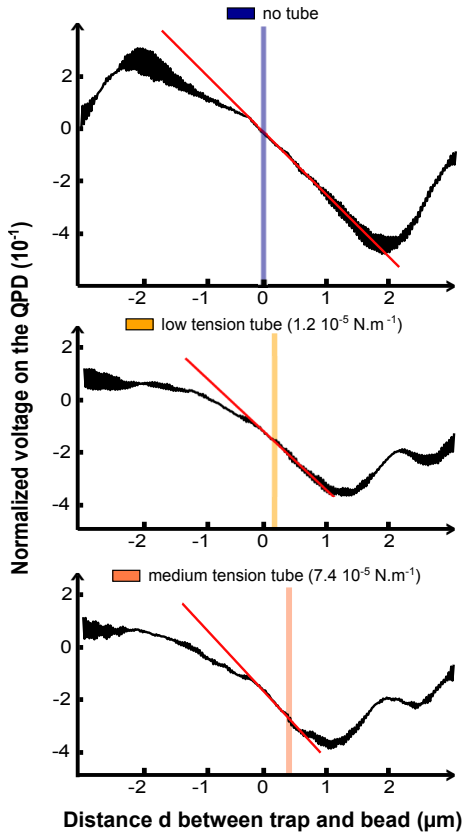


Figure 3.19 Courbes de calibration de la QPD réalisées sur une bille libre (a), et sur la même bille attachée à un tube de membrane à différentes tensions (b-c). Chaque régime linéaire est ajusté par une droite (en rouge). Les barres verticales représentent le lieu du mouvement de la bille une fois la calibration effectuée.

Heureusement, il reste toujours dans ces courbes une zone linéaire qui se réduit à mesure que la tension du liposome est augmentée. Le coefficient de linéarité change peu d'une courbe à l'autre (variation inférieure à 15 %), mais nécessite tout de même d'être remesuré avant toute mesure de force, ce que j'ai pu automatiser (Annexes C-D). Ces constatations faites, on peut alors vérifier que les mesures de tension données par la QPD correspondent à des positions (barres verticales) qui sont toujours dans la partie linéaire des courbes.

Nous sommes donc certains des mesures de positions relevées par la QPD. Pour vérifier la linéarité du piège lui-même, on peut cette fois observer la Fig 3.15.c qui montrait différentes mesures de forces de maintien du tube à différentes tensions. Le fait que les données issues d'un même liposome s'alignent sur une droite nous assure que la constante de raideur du piège n'évolue pas sur la gamme de forces considérées (entre 10^{-5} et 10^{-4} N.m⁻¹).

L'augmentation de l'écart-type des distributions de positions relatives entre bille libre puis bille attachée est donc bien imputable à un phénomène physique. Comme cet effet est intimement lié aux fluctuations de la bille au sein du piège, on a pour la suite tenter de caractériser ces fluctuations à l'aide d'un outil déjà utilisé sur le set-up pour calculer la constante de raideur du piège : la densité spectrale de puissance (PSD).

c) Différences de comportements de PSD entre bille libre puis attachée

Pour étudier les fluctuations de la position de la bille, on utilise la PSD qui décrit la répartition énergétique de ces fluctuations en fréquences de Fourier. Pour une bille libre, on a déjà décrit (cf II.2, III.5.b) que cette répartition suivait une courbe Lorentzienne (obtenue Fig 3.14). Mais qu'en est-il de la même bille attachée à un tube de membrane ? Le résultat de l'expérience est résumé Fig 3.20.

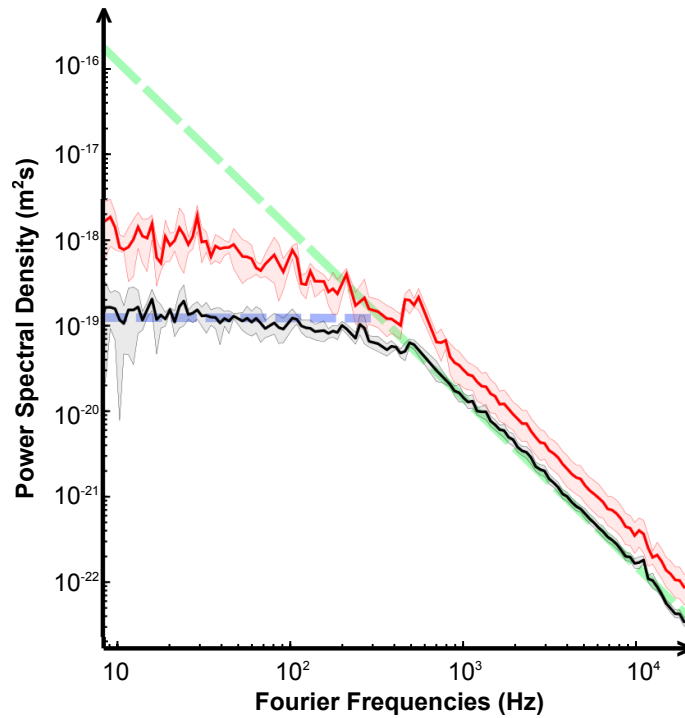


Figure 3.20 Densité Spectrale de Puissance (PSD) mesurée sur la même bille libre (courbe noire) puis attachée (courbe rouge). Les lignes en pointillés bleue, verte représentent respectivement un exposant nul, égal à -2.

Il apparaît dans cette figure que les PSDs d'une bille seule puis attachée diffèrent nettement. D'une part, on observe qu'à basse fréquence (entre 10-200 Hz), la PSD de la bille attachée n'est plus indépendante de la fréquence de Fourier considérée. D'autre part, à haute fréquence (entre 1-10 kHz), les deux PSDs possèdent cette fois la même dépendance en fréquence (du type f^{-2}), mais il y a un décalage entre les courbes qui fait apparaître une densité spectrale de puissance plus élevée pour la bille attachée.

Avant de caractériser ces différences entre bille libre et bille attachée au niveau de la PSD, je me suis d'abord focalisé sur les PSDs de billes seules pour pouvoir développer des méthodes d'analyse pour ces courbes.

d) Etude de PSDs de billes libres

Parmi toutes les PSDs sur des billes libres que j'ai pu effectuer pendant ma thèse, il y en a beaucoup qui ne présentent pas de plateau à basses fréquences. En fait c'est même un outil puissant qui m'a permis dans les expériences réalisées ici, d'éliminer les billes qui présentaient des défauts. Il se trouve que régulièrement j'ai pu observer qu'une bille qui donnait une PSD avec un exposant très différent de 0 à basses fréquences, était aussi le support de débris quelconques (lipides, ou autres particules que l'on peut trouver dans une chambre d'observation).

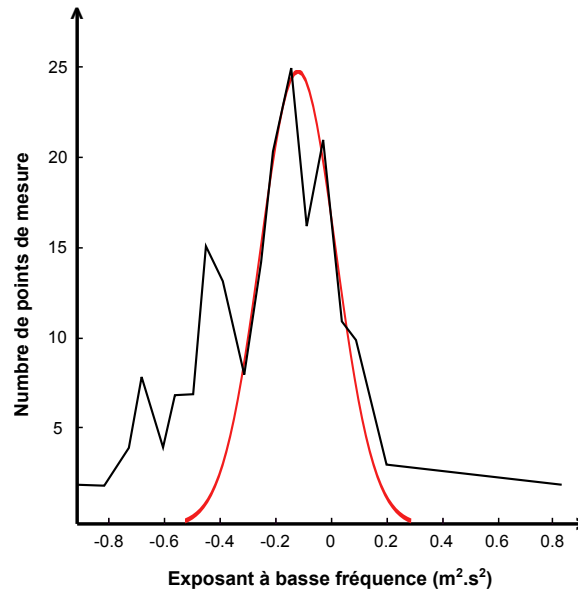


Figure 3.21 Distribution de la valeur de l'exposant à basse fréquence de 30 PSDs de billes différentes (mesurées 5 fois chacune). En rouge est tracée la gaussienne sur le pic principal de cette distribution.

Afin de suivre une méthode qualitative permettant de sélectionner les PSDs de billes utilisables pour les expériences de tirage de tube, j'ai mesuré pour 30 billes libres (toutes ces expériences ont été menées le même jour dans les mêmes conditions) l'exposant à basse fréquence (entre 10-200 Hz) de leur PSD et on obtient alors la distribution représentée Fig 3.21. La méthode de mesure de cet exposant est explicitée en annexe E. Le résultat est assez dispersé, puisque les billes streptavidinées peuvent facilement servir d'accroche aux débris inévitables (résidus issus de l'électroformation des liposomes, restes d'agrégats de β -caséine) qui se trouvent dans la chambre d'observation.

Pour fixer un 'intervalle de confiance' dans lequel on considérera que la bille est propre et utilisable dans les expériences de tirage de tube, une gaussienne (en rouge Fig 3.21) est superposée au pic principal de la distribution. En mesurant la largeur à mi-hauteur de cette gaussienne, on fixe $I = [-0.26 ; 0.04]$ comme étant l'intervalle de confiance des exposants à basse fréquence des billes libres. C'est ce type de billes répondant à ce critère que j'ai utilisé dans toutes mes expériences (après calibration). On remarque également que chaque bille est susceptible de donner une PSD différente et qu'il est donc nécessaire de garder la même bille pour comparer le statut libre et le statut attaché, d'où l'intérêt de notre montage qui permet la calibration *in situ*.

e) Caractérisation des fluctuations de billes attachées

L'exposant à basse fréquence de la PSD va permettre de caractériser une partie des différences entre bille libre et bille attachée. On va d'abord décrire tous ces changements que l'on a pu observer à partir de l'étude des modifications de la PSD. Ensuite, on observera ce que la perturbation de la tension du tube ou de sa longueur introduira comme nouvelles variations dans les PSDs.

Bille libre puis attachée

L'étude des PSDs de billes seules ayant permis de développer une méthode de mesure des exposants à basse fréquence, j'ai utilisé le même algorithme (Annexe E) pour mesurer ces exposants pour les mêmes billes attachées.

Les billes libres que j'ai gardées après calibration selon leur appartenance à l'intervalle de confiance I , possèdent ainsi un exposant à basse fréquence différent de ces mêmes billes attachées (Fig 3.22). On retrouve donc bien

l'observation faite à partir de la figure 3.20 : l'exposant est plus faible lorsque la bille est attachée à un tube de membrane.

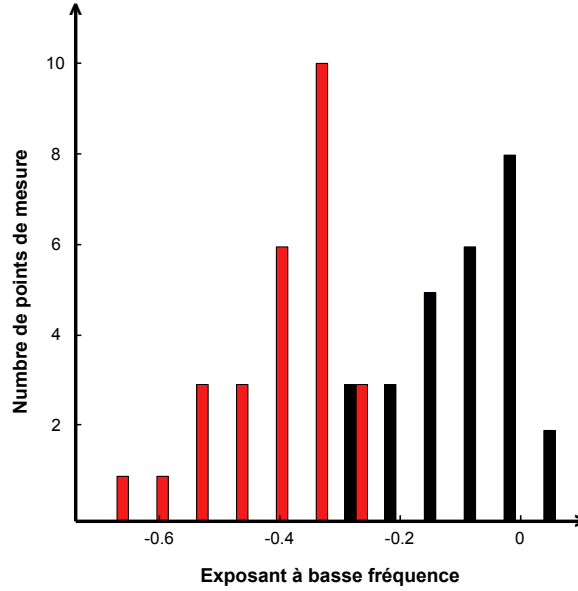


Figure 3.22 Distribution des exposants à basse fréquence des PSDs de billes libres (en noir) puis attachées à un tube de membrane.

Pour terminer de caractériser les différences entre ces deux régimes, on peut cette fois observer la partie haute fréquence de la PSD où l'on avait déjà noté un décalage entre bille libre puis attachée (Fig 3.20). On peut en effet mesurer le rapport des PSDs, τ , défini par :

$$\tau = \frac{1}{9000} \int_{1 \text{ kHz}}^{10 \text{ kHz}} \frac{PSD_{attachée}(f)}{PSD_{libre}(f)} df \quad Eq \ 3.10$$

Celui-ci est toujours positif sur chacune de nos expériences. Il est à longueur de tube courte ($5 \mu\text{m}$), et à tension faible (10^{-7} N.m^{-1}) de l'ordre de 1.5 ± 0.2 . Afin d'étudier ces fluctuations plus en détail, nous avons sondé l'influence de deux paramètres caractéristiques du tube : sa longueur et sa tension.

Effet de la longueur et de la tension du tube sur ses fluctuations

Maintenant que l'on a caractérisé les différences entre bille libre puis attachée, on va modifier l'état attaché en changeant les caractéristiques du tube afin d'observer les conséquences sur ses fluctuations. Dans un premier temps on

peut étudier l'évolution des distributions de la position de la bille dans le piège lorsque le tube est allongé (Fig 3.23) ou lorsque sa tension est accrue (Fig 3.24).

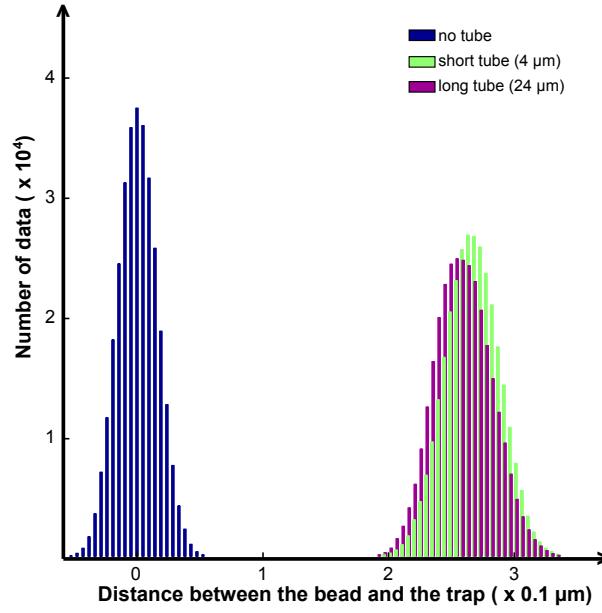


Figure 3.23 Distributions des positions d'une bille libre, puis attachée à un tube de longueur variable. Mesures enregistrées par la QPD pendant 5 secondes.

La force nécessaire au maintien du tube étant indépendante de sa longueur (II.2), on trouve, lorsque l'on ne modifie que cette dernière, que la moyenne de la distribution est peu altérée. L'écart-type change dans le cas de la modification de la tension comme de la longueur.

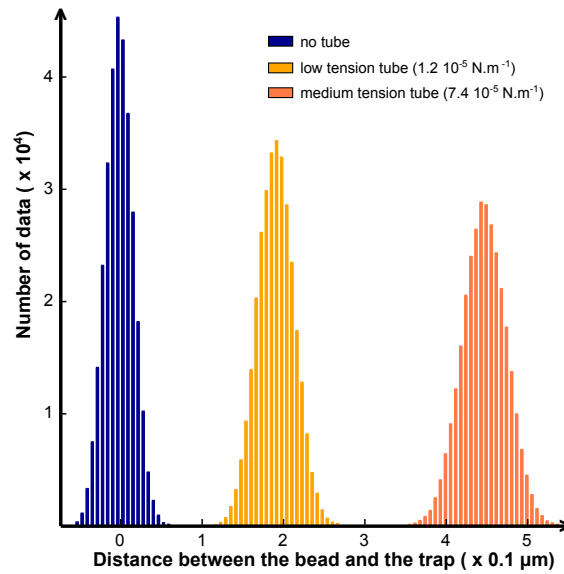


Figure 3.24 Distributions des positions d'une bille libre, puis attachée à un tube de tension variable. Mesures enregistrées par la QPD pendant 5 secondes.

Ces modifications se retrouvent également dans les PSDs associées (Fig 3.25-26), puisque l'on peut à nouveau remarquer une différence de comportement entre basses (10-200 Hz) et hautes (1-10 kHz) fréquences.

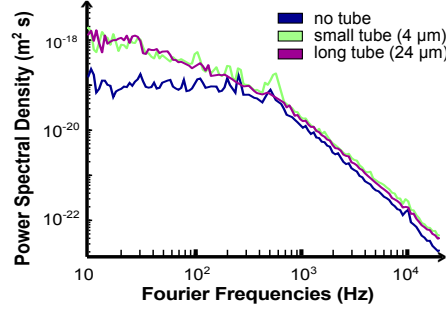


Figure 3.25 Effet de la longueur du tube sur la PSD. La PSD d'une bille libre (en bleu) est comparée à celles de la même bille attachée à un tube de membrane à différentes longueurs.

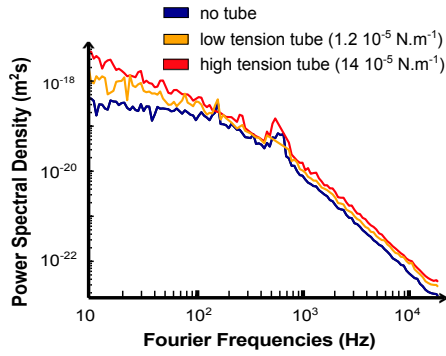


Figure 3.26 Effet de la tension du tube sur la PSD. La PSD d'une bille libre (en bleu) est comparée à celles de la même bille attachée à un tube de membrane à différentes tensions.

Et on peut finalement terminer de caractériser ces différences en calculant l'exposant à basses fréquences qui se rapproche le plus de la PSD, et le ratio τ introduit à l'Eq 3.9 pour les hautes fréquences pour chacune de ces perturbations (Fig 3.27).

On retrouve sur cette figure le fait établi précédemment : la PSD d'une bille change radicalement de comportement en passant de libre à attachée. Mais on obtient également d'autres informations en ce qui concerne la dépendance des fluctuations de la bille. Ces fluctuations apparaissent intimement liées aux caractéristiques physiques intrinsèques du tube de membrane maintenu entre la bille et le liposome.

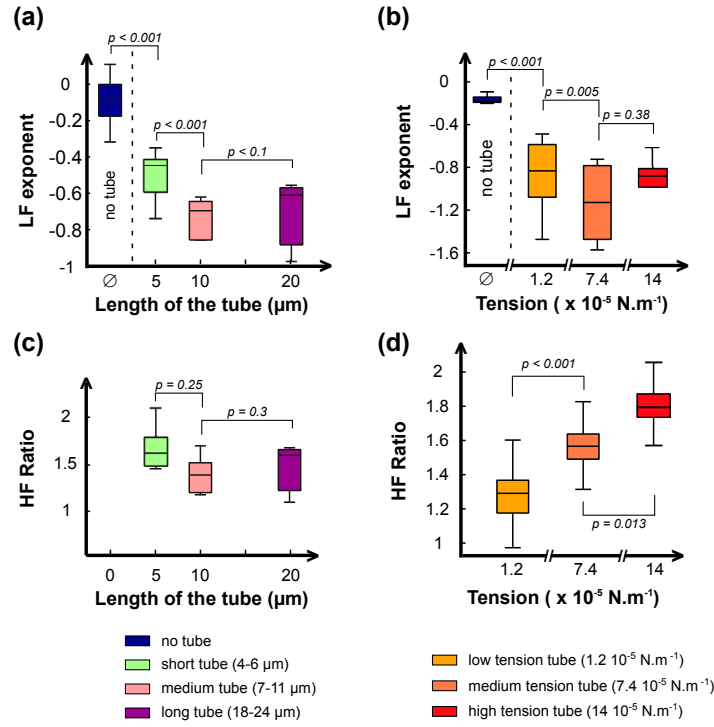


Figure 3.27 Caractérisations des régimes de PSDs obtenues en modifiant le tube de membrane. **a-b** Evolution de l'exposant à basse fréquence en fonction de l'augmentation de la longueur du tube ou de sa tension. **c-d** Evolution du rapport τ à haute fréquence en fonction de l'augmentation de la longueur du tube ou de sa tension.

En résumé de ces différentes observations : les fluctuations d'une bille attachée à un tube de membrane sous tension sont différentes des fluctuations de cette même bille lorsqu'elle était libre. En particulier les fluctuations en présence d'un tube affichent une dépendance en f à basse fréquence, et des amplitudes plus importantes à haute fréquence. Ces fluctuations sont également affectées par la modification des paramètres ajustables expérimentalement du tube (longueur et tension). On a jusqu'ici uniquement travaillé à partir de la tension normalisée de la QPD, soit V_{qpd} .

f) Et sur l'axe y ?

La perturbation des fluctuations de la bille en fonction de son état n'a été abordée qu'en se focalisant sur l'axe principal du tube de membrane. C'est sur cet axe que l'on anticipe en effet les plus grandes perturbations de fluctuations. Mais notre système permet aussi d'effectuer cette même analyse sur l'axe transversal en étudiant cette fois la tension V_{qpd}' définie par :

$$V_{QPD}' = \frac{V_1 + V_2 - (V_3 + V_4)}{V_1 + V_1 + V_3 + V_4} \quad Eq \ 3.10$$

Distribution des positions sur y :

On a la même attente que sur l'axe x : on souhaite une distribution gaussienne des positions (Eq 3.7) pour une bille libre. Il se trouve que c'est ce que l'on obtient expérimentalement ('free bead' en bleu sur les Fig 3.38-29). On peut alors se servir du calcul de l'écart-type de cette distribution pour mesurer k'_{trap} (de l'ordre de 6 pN. μm^{-1} , contre 40 pN. μm^{-1} pour k_{trap}), le coefficient de raideur du piège sur cet axe, en utilisant l'Eq 3.8. Cette assymétrie nous permet d'ailleurs d'accéder à de plus grandes mesures de forces sur x , tout en restant dans la linéarité du piège.

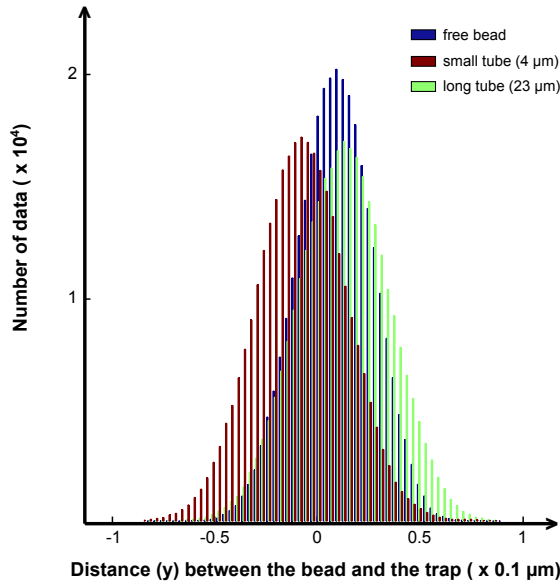


Figure 3.28 Distributions des positions sur y d'une bille libre, puis attachée à un tube de longueur variable. Mesures enregistrées par la QPD pendant 5 secondes.

De la même façon que pour l'axe x , on peut observer le changement de ces distributions en fonction de la longueur du tube tiré (Fig 3.28) et en fonction de sa tension (Fig 3.29).

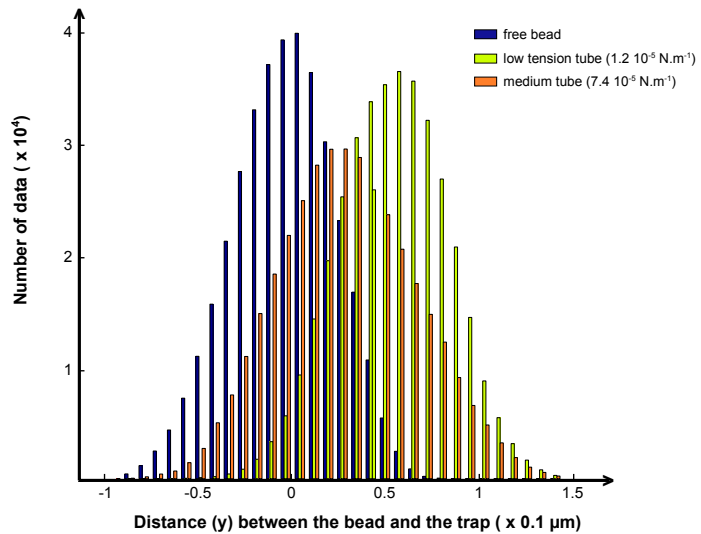


Figure 3.29 Distributions des positions sur y d'une bille libre, puis attachée à un tube de tension variable. Mesures enregistrées par la QPD pendant 5 secondes.

La moyenne des distributions de positions sur y varie moins que ce que l'on observait sur x entre bille libre puis attachée. Par contre on n'observe pas d'effets significatifs lors de la variation de la longueur du tube, alors que l'augmentation de la tension de celui-ci permet d'accroître l'écart-type de la distribution.

Fluctuation des positions sur y (PSD') :

Pour étudier plus finement les fluctuations sur cet axe, j'ai également observé les densités spectrales de puissances associées à la position de la bille sur y . Cependant, je n'ai pas observé (Fig 3.30) de modifications significatives de la PSD' entre la bille libre puis attachée.

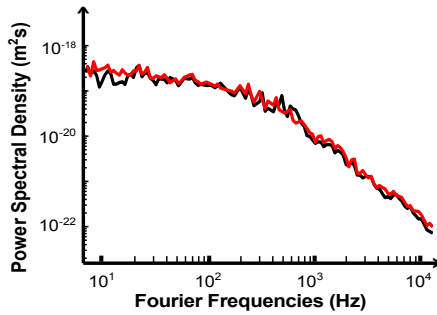


Figure 3.30 Densité Spectrale de Puissance sur l'axe y (PSD') mesurée sur la même bille libre (courbe noire) puis attachée (courbe rouge).

Il n'y a pas non plus de modifications significatives de cette courbe lorsque l'on change les paramètres du tube de membrane.

8) Conclusion sur les effets physiques observés

Etonnamment, on a observé qu'une bille libre était davantage contrainte dans ses mouvements, que lorsqu'elle était attachée à un nano-tube de membrane. En effet les écarts-types des distributions des positions (que ce soit sur x ou y), doublent quand la bille passe du statut libre à attachée (Fig 3.18).

Il n'y a pas d'autres modifications sur les fluctuations de la bille en y , ce qui montre d'une part que la mesure sur y par la QPD n'est pas polluée par la mesure en x (ce qui pourrait arriver en tournant les quadrants de la QPD), et d'autre part que les perturbations sur x sont liées au nano-tube.

La PSD (sur x) est modifiée au niveau des basses fréquences de Fourier (dépendance en fréquence) et des hautes fréquences (amplitudes toujours plus élevées, tout en gardant la dépendance en f^{-2}).

a) À basses fréquences (10-200 Hz) :

Le fait que la fréquence intervienne dans la PSD avec un exposant compris entre 0 et -2 nous indique que la bille se trouve dans régime viscoélastique.

Il est possible d'obtenir qualitativement une dépendance de la PSD à basses fréquences en prenant en compte des fluctuations du rayon du tube de membrane entre la bille et le liposome. La fonction de réponse d'un tube de membrane à une perturbation sinusoïdale est en effet connue [Nassoy, 2008] : le tube se comporte comme un objet visco-élastique de module complexe $\chi_t = \chi_t' + i\chi_t''$, avec $\chi_t' = \chi_t''$. La fonction de réponse complète du système, χ , est donc la combinaison de la fonction de réponse du tube χ_t et de l'environnement de la bille χ_e :

$$\chi = \frac{1}{\frac{1}{\chi_t} + \frac{1}{\chi_e}}$$

Cette description permettrait d'avoir une dépendance en fréquence, mais nous ne sommes pas parvenus pour l'instant à trouver une correspondance suffisante entre ce modèle et les données de fluctuation. Pour avancer dans cette partie, nous souhaiterions prendre en considération les modes de courbure du tube à rayon constant ('bending modes'). Cette étude théorique est développée en annexe H.

b) À hautes fréquences (1-10 kHz) :

La présence d'un tube modifie significativement ($\times 1.5$ environ, Fig 3.27) les amplitudes à hautes fréquences. En fait, en regardant les PSDs des billes attachées, celles-ci sont globalement toujours au-dessus des billes libres. L'intégration de ces PSDs va alors nous montrer que l'énergie totale des fluctuations d'une bille seule est toujours plus petite que celle d'une bille attachée. L'unique source d'énergie (source des fluctuations) de notre système étant l'agitation thermique, on ne sait pas encore comment expliquer ce résultat. Le préfacteur $k_B T / 6\pi\eta r_{bille}$ (cf Eq 2.7 qui décrit la PSD d'une bille libre) responsable de ce décalage ne peut en effet pas changer autant pendant l'expérience.

9) Polymérisation et tube de membrane

Les fluctuations de ce type de tube ne sont donc pas encore comprises, mais le dispositif de force ayant été validé (chapitre III.6), j'ai pu essayer de faire polymériser de l'actine à la surface du tube. Je vais d'abord présenter le protocole que j'ai suivi et nous observerons les résultats.

En plus de suivre toutes les étapes pour la préparation de l'expérience de tirage de tube, il faut préparer une autre micropipette dédiée à l'injection d'une solution contenant de l'actine-G, à même de polymériser à la surface d'un liposome, incubé avec un activateur de la polymérisation d'actine.

En premier lieu, il s'agit de préparer une micropipette supplémentaire, qu'il va falloir remplir de la solution à injecter. Celle-ci (décrite en annexe A), est constituée d'actine, et de profiline. Pour éviter que l'actine polymérise et bouche la micropipette, on forge son rayon de sortie de l'ordre de 10 μm , et on arrange le flux à sa sortie pour qu'il y ait toujours une injection (même très faible) de manière à ce que la solution extérieure ne vienne pas la contaminer en sel. Le fluide contenu dans le système hydraulique (réservoir de la micropipette) étant de l'eau distillée, on le sépare de la solution injectable à l'aide d'une épaisseur d'huile minérale.

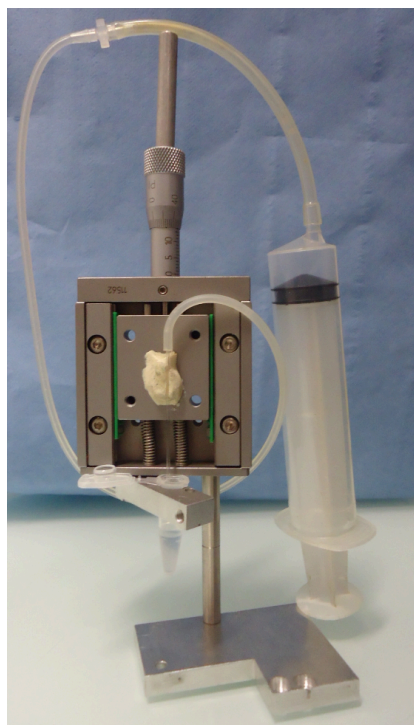


Figure 3.31 Dispositif de chargement d'une micropipette par aspiration.

Expérimentalement, on commence par charger la micropipette par le bas à l'aide du dispositif (constitué de montures d'optiques esseulées) présenté Fig 3.31. La solution injectable est placée dans un cône, et on aspire celle-ci à travers la micropipette avec un piston. On arrête l'aspiration à mi-hauteur environ.

Ensuite, on injecte à l'aide d'une seringue fine de l'huile minérale sur toute la longueur restante de la micropipette, sans insérer de bulles d'air pour éviter toute non-linéarité dans le contrôle du flux de sortie d'actine par le réglage de la hauteur d'eau du réservoir associé à cette micropipette.

La micropipette est ensuite insérée dans le montage au même moment que la micropipette d'aspiration, pour qu'elle soit elle aussi passivée par la β -caséine.

Les liposomes doivent subir une incubation pour que l'actine polymérise au niveau de l'extérieur de leur membrane. On utilise s-pVCA (un NPF présenté au chapitre I.3.c) que l'on incube 15 minutes (première étape de la polymérisation telle qu'elle est décrite en annexe A), avant de placer dans la chambre, en présence d'Arp2/3.

On a donc *a priori* tous les éléments nécessaires à l'observation de la polymérisation de l'actine sur ces tubes. Toutefois, dans les différents essais que j'ai pu réaliser, les liposomes en sortie d'incubation se sont révélés être beaucoup trop durs pour que je puisse en extraire un tube de membrane. En effet, je ne suis pas arrivé à obtenir une langue d'aspiration avec de tels liposomes sans atteindre des tensions capables de déchirer leur membrane. J'ai néanmoins pu tester la bonne polymérisation de l'actine sur les liposomes par cette méthode (Fig 3.32).

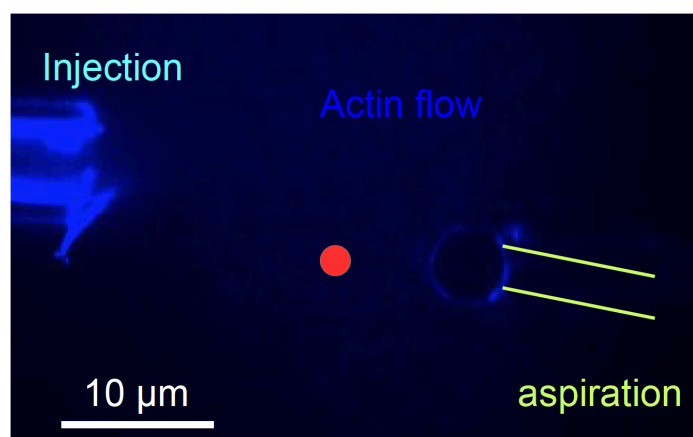


Figure 3.32 Image du dispositif de polymérisation d'actine par injection. On observe ici la fluorescence de l'actine marquée par A-488. Il n'y a pas de tube dans cet exemple. Le liposome n'est pas aspiré par la micropipette (en jaune). A gauche apparaît la micropipette d'injection, qui propulse l'actine en cône.

10) Discussion

Au début de ce chapitre, nous avions l'ambition de reconstruire une structure particulière observée *in vivo* lors des événements d'endocytose, la polymérisation de l'actine sur des nano-tubes de membrane. Nous avons d'abord cherché à développer notre montage optique pour être capable de mesurer des forces, et en particulier, de mesurer les forces de polymérisation de l'actine sur un tube de membrane. Après plusieurs modifications, on a pu valider l'acuité de

notre dispositif en mesurant des modules de courbure dont la valeur était connue. Au-delà de cette simple vérification, on s'est rendu compte que l'on pouvait atteindre des résolutions temporelle et spatiale donnant accès pour la première fois à l'étude des fluctuations de ces tubes de membrane. Ces fluctuations se sont révélées être très complexes en terme de dépendance, mais aussi à interpréter théoriquement. Finalement, j'ai tenté de faire polymériser de l'actine à la surface extérieure de ces tubes, mais j'ai été gêné par les effets du nucléateur utilisé (s-pVCA), qui rendait les liposomes trop tendus.

Pour essayer de contourner cette tension trop importante, et pour mieux comprendre l'action de s-pVCA sur la surface des liposomes incubés, je me suis intéressé aux tubes de membrane tirés à très basse tension.

Chapitre IV

Tubes basse tension, et polymérisation d'actine.

Sommaire :

- 1) Tubes basse tension
 - a- Introduction et présentation du montage
 - b- Caractérisation des tubes basse tension
 - c- Modélisation
 - d- Discussion

- 2) Etude de la polymérisation d'actine dans le cadre d'un cortex *in vitro*
 - a- s-pVCA et activité
 - b- Observations de la polymérisation d'actine
 - c- Observation en continu
 - d- Etude des effets de la myosine VI sur la contraction du réseau
 - e- Discussion

- 3) Conclusion

Jusqu'à présent, nous avons formé des tubes à partir de membranes soumises à une tension relativement importante (Fig 3.16, 3.19), autour de 10^{-5} N.m⁻¹. C'est une tension de membrane qui reste très éloignée de la tension de lyse (rupture de la bicouche lipidique du liposome), de l'ordre de 10^{-3} N.m⁻¹, mais relativement élevée quand on mesure la tension de ces liposomes avant aspiration de l'ordre de 10^{-8} N.m⁻¹ [Faucon, 1989]. Cette valeur peut encore être abaissée en se plaçant dans un milieu hyper-osmotique [Döbereiner, 1997]. Dans les expériences précédentes (cf chapitre III), la micropipette qui maintenait le liposome introduisait une surtension par l'aspiration d'une langue suffisamment grande pour utiliser la loi de Laplace. Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord nous affranchir de l'utilisation de ces micropipettes, et même des billes, pour pouvoir créer des tubes de membrane à très basse tension, en dégonflant osmotiquement les liposomes et en piégeant directement la membrane des liposomes. Après avoir caractérisé ces tubes, nous chercherons à polymériser l'actine sur ceux-ci. Enfin, confrontés à des difficultés déjà rencontrées avec les tubes tirés à haute tension, nous nous concentrerons ensuite sur la polymérisation d'actine en l'absence de tube.

1) Tubes à basse tension

Pour obtenir des tubes dits à 'basse tension', c'est-à-dire obtenus avec des tensions de membrane de l'ordre de 10^{-9} N.m⁻¹, nous avons dû trouver une façon de tirer sur un liposome sans le maintenir à l'aide d'une micropipette qui introduit une augmentation de sa tension de membrane. Après avoir présenté cette méthode, basée sur l'utilisation d'une multi-pince optique (un seul faisceau 'piège' partagé en temps en plusieurs endroits grâce à l'emploi des AODs) pour piéger directement la membrane, nous étudierons les mesures réalisées sur ces tubes.

a) Introduction et présentation du montage

Tout d'abord, pour obtenir un tube il faut nécessairement maintenir le liposome d'une part, et tirer ponctuellement en un point pour le faire changer de forme d'autre part [Derényi, 2002].

Maintenir

Expérimentalement, déformer une membrane déjà 'floppy' (dont les fluctuations de membrane sont importantes) est assez facile. Pour déformer davantage le liposome et obtenir un tube, il faut, en plus, être capable de maintenir le liposome pour l'empêcher de suivre toujours le lieu de la pince

destinée au tirage de tube. Mais nous souhaitons ne pas aspirer le liposome afin de le conserver ‘floppy’. Nous avons donc pensé piéger optiquement la membrane lipidique elle-même, vu que celle-ci possède un indice de réfraction plus élevé ($n_{\text{lipide}} = 1.47$, [Ohki, 1968]) que le milieu extérieur environnant ($n_{\text{tampon}} = 1.39$). Pour ce faire, nous avons utilisé la rapidité des AODs (présentés au III.1) pour créer à partir d’un seul faisceau laser, plusieurs faisceaux lasers partagés en temps [Visscher, 1996]. En suivant le type de parcours présenté Fig 4.1, il est en effet possible de créer plusieurs pinces, d’intensités variables.

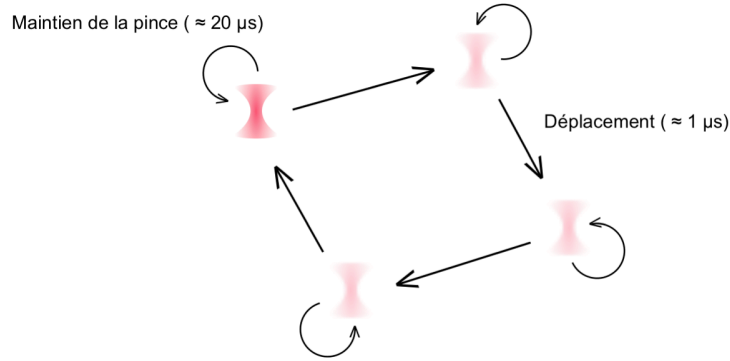


Figure 4.1 Schéma de partage du laser entre quatre pièges. Pour déterminer la puissance d’un piège partagé en temps, il faut prendre en compte le temps passé par le laser dans une position, mais aussi le temps de repos sur chacun des pièges ainsi que les temps de passage d’un piège à l’autre. Avec un faisceau d’intensité constante, la constante de raideur de chacun de ces pièges est proportionnelle au temps de repos du faisceau sur ce piège, divisé par le temps d’un cycle complet. L’utilisation des AODs permet ici de changer l’intensité de chacun de ces pièges sans modifier leur temps de maintien.

Il est alors possible, par exemple, de déformer un liposome originellement sphérique en un objet plus anguleux (Fig 4.2).

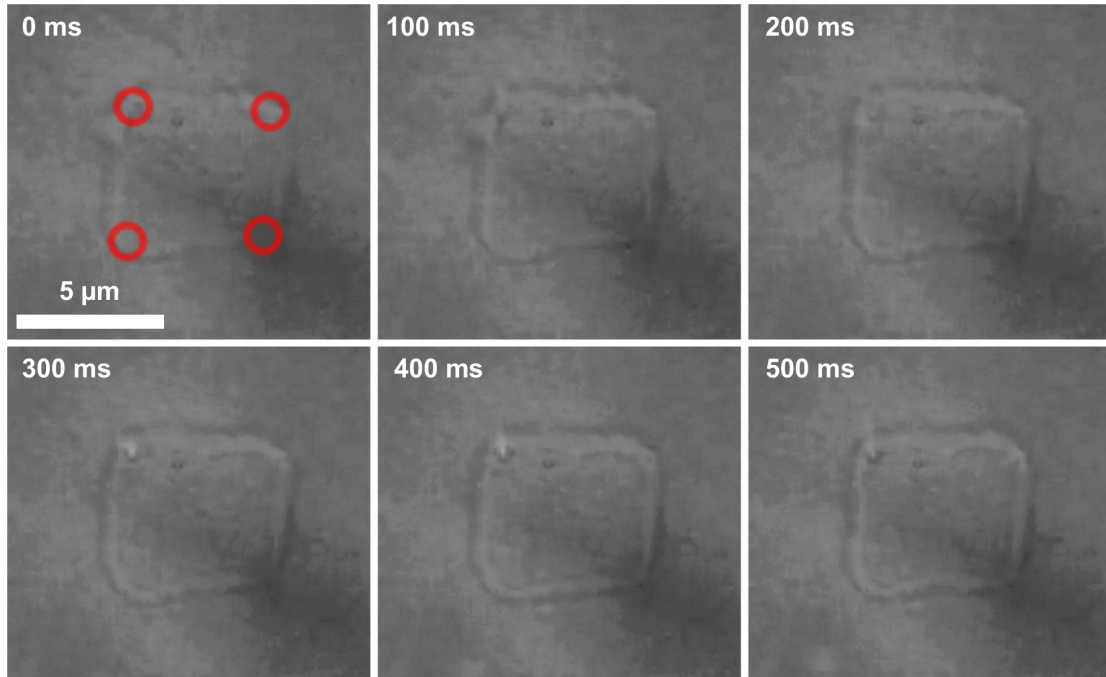


Figure 4.2 Suivi d’un liposome au cours du temps, déformé par 4 pinces optiques immobiles représentées par les cercles rouges sur la première image. Images obtenues en champ clair. La mutli-pince optique est issue d’un laser partagé en temps. Chaque piège a ici la même intensité.

Mais sans aller jusqu'à déformer les liposomes en carrés, cette technique permet de maintenir la membrane en plusieurs endroits, et de ne plus faire appel à l'aspiration d'une micropipette.

Tirer

Précédemment, j'utilisais des billes streptavidinées qui pouvaient se coller aux lipides biotinylés, présents dans la bicouche lipidique des liposomes, pour pouvoir tirer un nano-tube de membrane à partir du liposome. Ce n'est plus possible d'utiliser de telles billes pour obtenir des tubes à basse tension, puisque les liposomes dans un état aussi détendu, 'floppy', ont des formes qui fluctuent beaucoup, et qui peuvent rapidement englober la bille sonde et empêcher le tirage de tube.

On a ainsi à nouveau utilisé directement le piège optique sur la membrane du liposome. En choisissant un liposome suffisamment volumineux pour que son poids (non nul à cause de la différence de composition des milieux intérieur et extérieur, cf annexe A) ne soit pas compensé par la pression de radiation des pièges optiques, pour éviter la lévitation du liposome [Ashkin, 1971], il est alors possible de jouer sur le nombre de pièges créés et leur intensité pour à la fois maintenir le liposome tout en obtenant un tube basse tension comme présenté sur la Fig 4.3.

Cependant, il faut souvent plusieurs essais avant de parvenir à obtenir un tube. L'utilisation des pinces optiques a en effet une influence sur la tension de membrane, puisqu'en accumulant l'excès de membrane au niveau du piège, cela contribue à augmenter la tension [Bar-Ziv, 1994]. Baisser la puissance de chacun des pièges diminue cette surtension, mais il est alors impossible de déformer suffisamment le liposome pour avoir un tube. Il faut donc trouver un compromis. On ne peut pas non plus avoir des liposomes trop 'floppys' au départ, car plus la différence d'osmolarité est importante entre solutions intérieure et extérieure, plus il y a de débris (amas lipidiques – liposomes trop petits) dans la chambre d'observation.

La topologie des liposomes, à différence d'osmolarité importante (Fig 1.14) est d'autant plus complexe et surtout, les fluctuations thermiques sont prépondérantes sur le terme lié à l'énergie de courbure dans l'hamiltonien de Helfrich (Eq 1.5). L'intégrité des liposomes est alors menacée par l'agitation thermique. Les débris occasionnés finissent par prendre la place de la membrane du liposome maintenu dans les pinces optiques, le libérant.

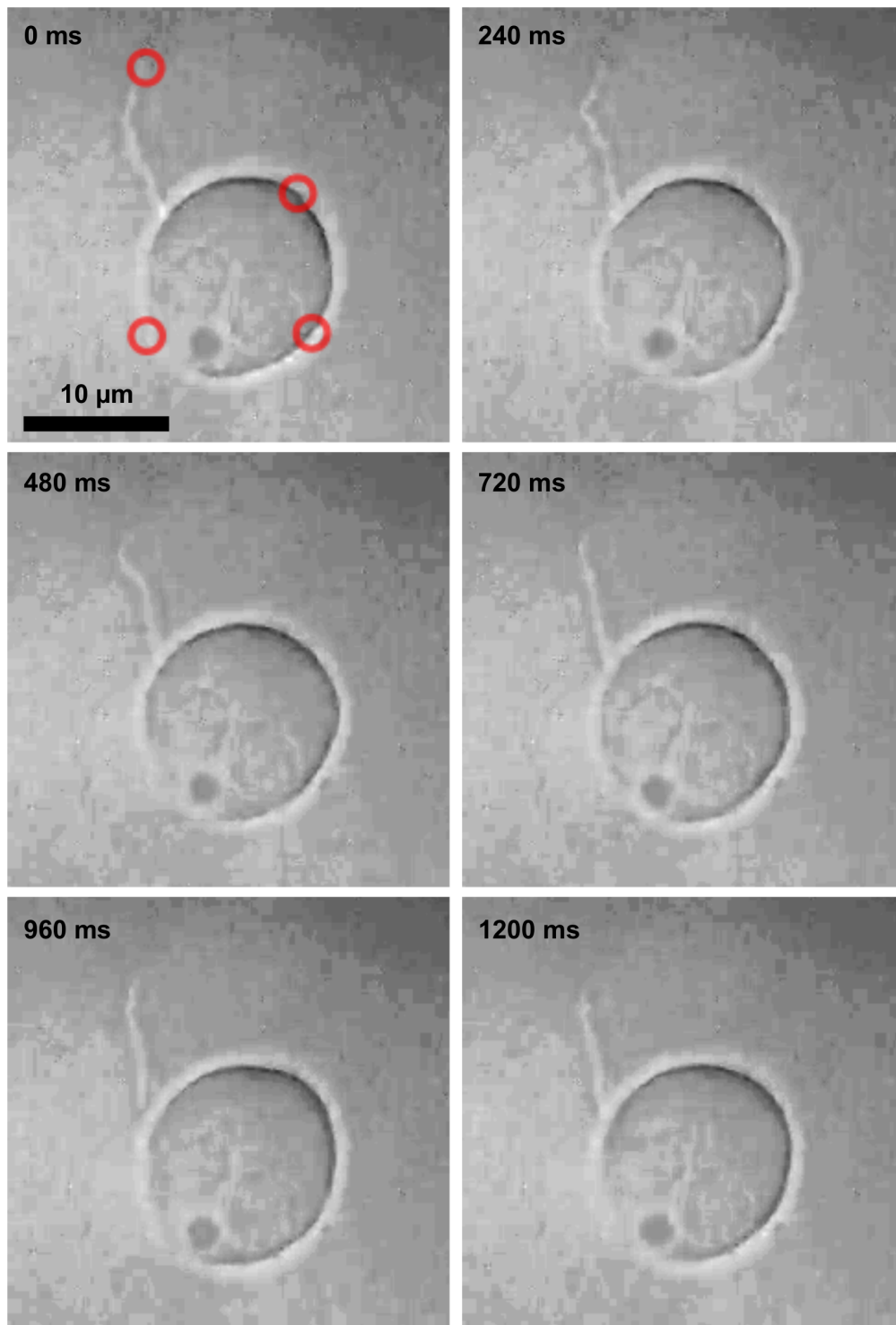


Figure 4.3 Suivi d'un tube basse tension au cours du temps. Le tube de membrane que l'on peut observer fluctue. Il est visible à cette échelle en champ clair, sans dispositif de contraste de phase. Pour empêcher la fuite du liposome en direction du tube, la puissance du piège opposée au tube en bas à droite sur la première image est légèrement supérieure aux autres pièges.

L'utilisation d'un piège optique directement au niveau de la membrane pour la déformer et obtenir un tube à très basse tension est nouvelle et n'a jamais été ni développée, ni appliquée. Classiquement, la pince optique sert à manipuler les objets micrométriques, comme des billes, collées à la membrane. Les travaux qui pourraient se rapprocher le plus de notre manipulation directe de la membrane sont les déformations engendrées par le faisceau utilisé pour étudier la mécanique de cellules ou de liposomes [Wu, 2015 ; Delabre, 2015 ; Bambardekar, 2015]. D'autres travaux [Turlier, 2016] consistent à mesurer les fluctuations de membrane à travers les déviations du faisceau.

Par ailleurs, cette méthode nous prive de mesurer des forces avec la technique développée précédemment (chapitre III) dans laquelle le comportement de la bille piégée était connu (paragraphe II.2). Ici, étant donné que l'on piège directement la membrane, qui est un objet non sphérique et hétérogène, la force exacte exercée par la pince sur la membrane n'est pas connue [Bui, 2013].

b) Caractérisation des tubes basse tension

Au départ, j'ai souhaité vérifier que les tubes obtenus de la manière décrite précédemment étaient bien des tubes basse tension en se basant sur l'analyse du rayon du tube. Les images étant obtenues par une simple caméra vidéo, j'ai également tenté d'analyser les déformations du faisceau laser à l'aide d'une QPD (comme au chapitre III.3) pour améliorer la résolution spatio-temporelle des bords du tube, ce qui n'a pas abouti. Finalement, les images permettant une description des différentes configurations prises par un tube donné à basse tension, nous avons tout de même pu accéder aux fluctuations de ce type de tube en analysant l'ensemble de leurs changements de forme.

Diamètre du tube

On a déjà vu que le rayon d'un tube de membrane r_{tube} tiré d'un liposome était lié à son module de courbure κ ainsi qu'à sa tension de membrane σ (Eq 2.2 rappelée ici).

$$r_{tube} = \sqrt{\kappa/2\sigma} \quad Eq\ 2.2$$

Dans un premier temps, j'ai donc tracé plusieurs profils d'intensité orientés perpendiculairement au tube (Fig 4.4) de manière à être capable d'en tirer une mesure du rayon r_{tube} .

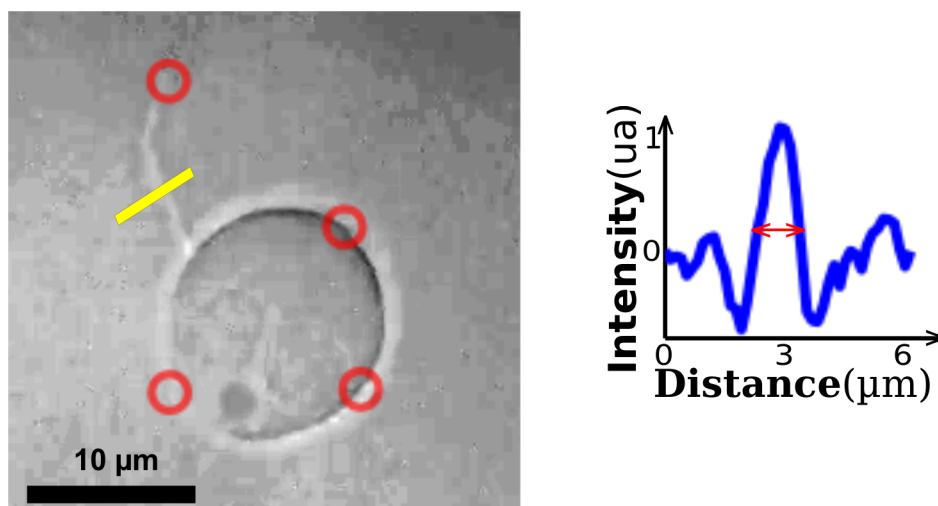


Figure 4.4 Profil d'intensité mesuré le long du segment jaune perpendiculaire au tube. Le profil rencontrant sur son passage deux bicouches lipidiques, le diamètre du tube est mesuré de la même façon que l'a été le liposome ou la langue dans les expériences du III, en cherchant les points d'inflexion sur le profil (cf Annexe F).

J'ai également étudié les variations du rayon du tube le long de celui-ci (Fig 4.5). On obtient cependant un écart-type de ces mesures du même ordre que la taille d'un pixel (résolution minimale) soit $0.138 \mu\text{m}$, ce qui signifierait que le tube aurait un rayon constant.

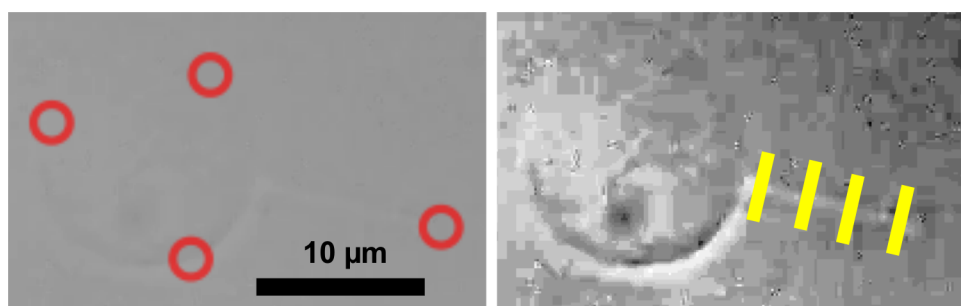


Figure 4.5 Image en champ clair d'un tube à basse tension (à droite, le contraste a été augmenté pour faire apparaître le tube). Les cercles rouges symbolisent les pinces optiques, les traits jaunes représentent les portions de tube sur lesquelles j'ai mesuré le rayon.

Parfois, il arrive que le tube se déporte du plan d'observation. Il est également possible qu'il possède des courbures variables. Tout cela complique l'automatisation de l'étude du rayon de ces tubes, c'est pourquoi j'ai choisi de déterminer les points de mesures manuellement.

J'ai pu mesurer les rayons de 6 tubes, obtenus sur des liposomes différents et de longueurs bout-à-bout différentes (allant de 4 à $10 \mu\text{m}$) :

$$r_{\text{tube}} = (0.77 \pm 0.12) \mu\text{m}$$

En reprenant la valeur trouvée au III.6 pour le module de courbure κ , et en appliquant l'Eq 2.2 rappelée plus haut, on trouve comme tension de membrane :

$$\sigma \approx (3.0 \pm 0.9) 10^{-8} N.m^{-1}$$

On est donc bien dans un régime de très basse tension, près de trois ordres de grandeur en dessous de la tension obtenue classiquement avec la micropipette.

Utilisation de la QPD

Comme la mesure du rayon du tube est limitée par la résolution de notre caméra (ici 1 pixel = 0.138 μm), nous avons pensé à utiliser la diode quatre quadrants afin d'améliorer la précision de la mesure. En effet, la membrane lorsqu'elle se trouve au centre du piège, dévie le faisceau laser du piège. Nous avons donc réalisé un balayage transversal du tube par un faisceau laser 'sonde', de très faible puissance pour ne pas introduire de perturbation sur le tube, tout en enregistrant les tensions délivrées par la QPD. Malheureusement, ces mesures, dont un exemple est donné Fig 4.6, apparaissent très bruitées, ce que l'on comprend du fait de la faible puissance du laser. La durée d'un cycle complet de balayage du faisceau qui doit également tenir le liposome entre-temps (soit 100 μs entre chaque point de mesure) pour obtenir un profil du tube sur 3 μm (pour capturer ses fluctuations) avec un pas de 100 nm (pour être au même niveau de la taille d'un pixel sur notre caméra), est de l'ordre de 3 ms, ce qui *a priori* semble suffisant (au regard du suivi Fig 4.3). La puissance du laser sonde, forcément limitée pour éviter qu'il happe le liposome, paraît être ici la limitation de ce type de mesure.

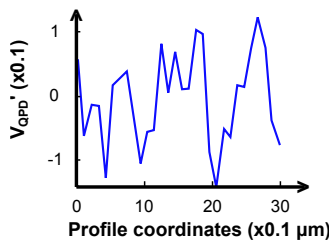


Figure 4.6 Profil transversal d'un tube mou obtenu par QPD. Le tube étant étiré selon l'axe des X dans cette expérience, on mesure les déviations du faisceau selon l'axe des Y, d'où V_{QPD}' .

Analyse des trajectoires du tube

La figure 4.3 montre, en plus de la simple réalisation d'un tube basse tension, que celui-ci fluctue au cours du temps, ce qui est illustré par les différentes positions du tube à des temps différents. On peut tracer l'ensemble des configurations (ou chemins) que le tube a pu avoir au cours de son

observation (tous les pièges par ailleurs immobiles). Comme le point d'accroche (B) du tube sur le liposome varie peu dans le temps comparé aux pérégrinations du tube, et que le tube est tenu à son autre extrémité (A) par un piège optique immobile, on peut superposer l'ensemble de ces chemins en fixant le point A en $(0,0)$, et le point B en $(0, L_{A-B})$ où L_{A-B} est la distance AB. On obtient ainsi une structure en fuseau, comme celles présentées Fig 4.6.

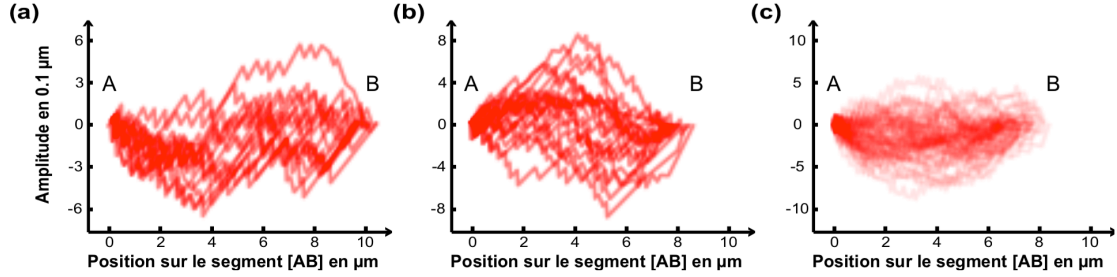


Figure 4.6 Superposition des différents chemins empruntés par des tubes basse tension. a-b Chronologies obtenues sur 10 secondes sur deux tubes différents. Sur un temps aussi court, la moyenne des fluctuations n'est pas centrée exactement sur 0. c Chronologie obtenue sur une minute. La forme de fuseau est nettement plus remarquable ici. A étant un point fixe, il est toujours placé en $(0,0)$. B est mobile, en $(0, L_{A-B})$. On peut ici vérifier que l'on reste dans l'approximation des petites déformations.

Le suivi de la déformation du tube au cours du temps nous permet de visualiser les fluctuations de celui-ci, dont nous proposons maintenant une modélisation simple.

c) Modélisation

D'après les résultats expérimentaux ci-dessus, le tube entre le liposome (B) et son autre extrémité (A) subit des fluctuations qui le déforment autour d'un segment [AB]. L'amplitude de ces déformations apparaît toutefois très faible devant la longueur du tube L . A partir de l'équation résultant du principe fondamental de la dynamique pour un élément de corde, nous étudierons la résolution de ce système à l'aide d'une solution générale simplifiée, ce qui nous permettra d'avoir une interprétation énergétique des modes existants dans la corde.

Hypothèses et notations

Pour les calculs qui vont suivre, je vais ici faire des hypothèses simplificatrices sur le système. On supposera que la tension du tube (soit la force nécessaire à maintenir le tube) est constante au sein du tube et vaut T_0 . Comme $r_{tube} \ll L$, et on va modéliser le tube par une corde simple, purement élastique. De plus comme l'amplitude des déformations $u(x,t) \ll L$, où on

repère la position x comme le projeté du tube sur $[AB]$, on considérera que l'on est dans le cadre des petites déformations et on prendra $L_{A-B} = L$. Le fait que A et B soient fixés dans le temps nous place dans des conditions limites de type Dirichlet, c'est-à-dire que les déformations doivent vérifier le système :

$$\begin{cases} u(A, t) = 0 \\ u(B, t) = 0 \end{cases}$$

L'équation de d'Alembert

On a en fait réduit notre problème à l'étude d'une corde modèle, c'est-à-dire inextensible, de masse linéique μ , tendue uniformément horizontalement à la force constante T_0 , dont on va étudier les vibrations transversales.

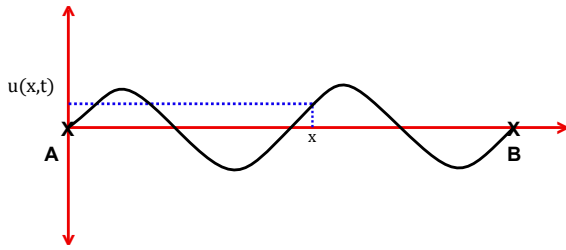


Figure 4.7 Schéma de départ de la modélisation.

On reconnaît un problème déjà rencontré par Jean le Rond d'Alembert au 18^{ème} siècle [Euler, 1980] dont l'équation s'écrit sous la forme :

$$\frac{\partial^2 u(x, t)}{\partial x^2} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 u(x, t)}{\partial t^2} \quad \text{Eq 4.1}$$

Avec c la célérité des ondes qui se propagent dans la corde qui vaut :

$$c = \sqrt{T_0/\mu} \quad \text{Eq 4.2}$$

Où μ est la masse linéique de la corde. Dans le cadre d'un tube de membrane, on peut complexifier l'Eq 4.2 pour prendre en compte le fait que le tube de membrane résiste à la courbure, et que le tube soit dans un environnement très visqueux avec beaucoup de frottements. Ainsi on a :

$$\mu \frac{\partial^2 u(x, t)}{\partial t^2} = T_0 \frac{\partial^2 u(x, t)}{\partial x^2} - EI \frac{\partial^4 u(x, t)}{\partial x^4} - \alpha \frac{\partial u(x, t)}{\partial t} \quad \text{Eq 4.3}$$

Où E le module d'Young du tube, I son facteur de forme pour le terme de courbure, et α est le coefficient de frottement dynamique du tube dans l'eau. Le second terme du membre de droite (Eq 4.3) représente la résistance à la courbure de la corde, le troisième et dernier représente l'action des frottements

sur la corde. En calculant l'amplitude des fluctuations d'une corde tendue en son milieu, en suivant le calcul détaillé en annexe I, on arrive à :

$$\begin{aligned}
 \left\langle \left(U \left(x = \frac{L}{2}, t \right) \right)^2 \right\rangle_{temps} &= \frac{1}{2} (A)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{\sin \left(\frac{n \pi L}{2} \right)}{n} \right)^2 \\
 &= \frac{1}{2} (A)^2 \sum_{k=0}^{\infty} \left(\frac{1}{2k+1} \right)^2 \\
 &= \frac{1}{2} (A)^2 \frac{\pi^2}{8} = \boxed{\frac{k_B T L}{4 T_0}} \quad \text{Eq 4.17}
 \end{aligned}$$

Cette relation correspond au cas simplifié de la relation de dispersion écrite à l'Eq 4.3, sans les termes de correction liés à la rigidité du tube et de la viscosité du milieu. Pour le terme de rigidité, on a $EI = \pi \kappa r_{tube}$ de l'ordre de 10^{-30} Pa, donc on va continuer à négliger ce terme. Et pour le cas des frottements, ceux-ci ne vont pas perturber les énergies calculées à l'équilibre. On prendra donc par la suite l'Eq 4.17 comme bonne approximation du problème considéré.

Mesure de Force

A partir des fuseaux que l'on a tracés Fig 4.5, on peut établir l'histogramme des amplitudes des déformations du tube mesurées en son milieu pour accéder à $(U(x = L/2, t))^2$. Le résultat est une forme qui s'apparente à une gaussienne, dessinée Figure 4.8.

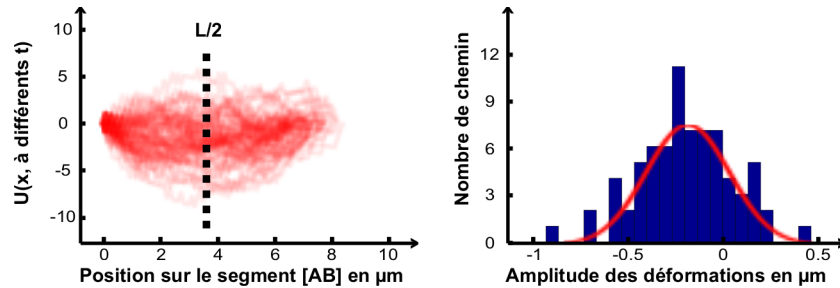


Figure 4.8 Histogramme des amplitudes de déformations d'un tube basse tension. En partant de l'image d'un fuseau (à gauche) retraçant les différentes configurations parcourues par un tube, on peut calculer le lieu des points en $L/2$ (à droite), et ajuster une gaussienne (en rouge) à la distribution obtenue.

Les histogrammes obtenus ne sont pas exactement centrés sur 0, comme le prédisait notre modèle. Expérimentalement, cet écart peut être expliqué par un flux présent localement dans la chambre d'observation. La pression de radiation des différents pièges optiques, par exemple, crée un mouvement d'ascension au sein de la zone d'observation.

Sur cet exemple (Fig 4.8), on peut calculer la variance de l'amplitude des déformations et obtenir $V_{ar} = 0.017 \mu m^2$. Cela permet donc de mesurer la tension de la corde T_0 correspondant à la force de maintien du tube F_0 , autrement dit la force nécessaire au maintien du tube en utilisant la formule obtenue par la modélisation.

$$F_0 = \frac{k_b T L}{4 V_{ar}} = 2.3 \cdot 10^{-13} N$$

Ce qui revient à dire que la tension de membrane et le rayon du tube sont respectivement :

$$\sigma = 1.86 \cdot 10^{-8} N.m^{-1}, r_{tube} = 0.97 \mu m$$

Ces valeurs sont très proches de celles obtenues en utilisant comme point de départ le rayon du tube à basse tension. Notre modèle permet donc de rendre compte de la physique du tube à basse tension.

d) Discussion

Les deux méthodes que l'on a pu mettre en œuvre pour mesurer les caractéristiques du tube d'une part, en utilisant directement les données de variations du rayon du tube en analysant les images de la caméra, puis d'autre part, en essayant une modélisation directe des contours moyens du tube par une corde parfaite, ont abouti à des résultats similaires. On a pu ainsi valider notre modèle théorique.

Je ne suis pas allé jusqu'au bout de la complexité du modèle présenté à l'Eq 4.3 puisque les résultats obtenus au premier ordre m'ont permis de retrouver les caractéristiques du tube observées expérimentalement. Il est donc possible que ce modèle s'applique également aux tubes à haute tension, les corrections apportées par la raideur du tube ou les frottements visqueux devenant de plus en plus négligeables par rapport au terme issu des forces de tension (Eq 4.5). Cette modélisation ne permet toutefois pas de relier directement ces résultats avec ceux obtenus sur les tubes à haute tension (PSD)

puisqu'il y a moins de précision (fréquence d'acquisition des images de l'ordre de 30 Hz vs 150kHz pour la QPD).

Pour rapprocher ce système *in vitro* du phénomène d'endocytose, j'ai cherché à faire polymériser de l'actine sur les tubes basse tension. J'aurais alors tenté de comprendre les effets de cette polymérisation sur la membrane, tout en étant potentiellement capable de caractériser ces effets plus précisément que dans le cadre d'un cortex d'actine se formant sur un liposome, notre système échappant à la géométrie sphérique d'un simple liposome. Je n'en ai malheureusement pas eu le temps, la mise au point de cette expérience s'est révélée très ardue. Finalement j'ai étudié la polymérisation d'actine dans le cadre de la reproduction d'un cortex d'actine à l'extérieur d'un liposome sphérique *in vitro*.

2) Etude de la polymérisation d'actine dans le cadre d'un cortex *in vitro*

Comme pour les expériences menées au chapitre III.9, l'activateur de la polymérisation d'actine pVCA-streptavidine (s-pVCA), introduit au I.3.c, s'est révélé être un obstacle dans l'obtention d'un cortex d'actine autour d'un tube mou. Dans un premier temps, je vais préciser de quelle manière cet activateur très efficace pour la polymérisation, s'avère être handicapant pour tirer des tubes basse tension. Nous aborderons ensuite différentes techniques que nous avons tentées pour contourner le problème et les observations qui ont suivi sur la polymérisation d'actine, notamment avec l'utilisation de la myosine VI.

a) s-pVCA et activité

Cette protéine, dont la construction (détaillée au I.3.c) permet d'être toujours active dans le recrutement du complexe Arp2/3, peut se lier à l'aide de sa partie streptavidine à la biotine des lipides biotinylés contenus dans la membrane des liposomes électroformés. Cependant, la streptavidine est une protéine homotétramère où chacune de ses sous-unités est un site de fixation potentiel pour la biotine [Green, 1975]. L'ajout de la s-pVCA est donc susceptible de fixer la position de plusieurs lipides, risquant ainsi d'augmenter la tension de la membrane du liposome, ce qui est effectivement observé expérimentalement (Fig 4.9) où des liposomes initialement 'floppys' (détendus) sont incubés avec du s-pVCA. L'augmentation de la tension de membrane de ces liposomes est en effet le signe d'une surpression entre l'intérieur et l'extérieur (utilisation de la loi de Laplace écrite à l'Eq 1.7).

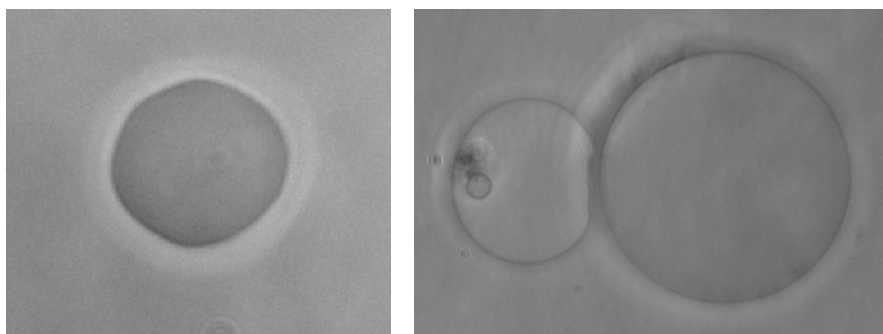


Figure 4.9 Liposome ‘floppy’ (détendu) puis observé après 15 min d’incubation avec s-pVCA (100 nM).

Non seulement le s-pVCA est responsable de l’augmentation de la tension de membrane des liposomes mais il est aussi coupable d’une perte de contraste des liposomes (le contraste étant dû à la différence de composition entre milieu intérieur et milieu extérieur, cf annexes A-B). En comptabilisant les liposomes en sortie d’électroformation (après une dilution par deux dans la solution extérieure) et ceux issus d’une incubation avec s-pVCA (même dilution), on peut en effet observer qu’ils sont de moins en moins nombreux, et de moins en moins contrastés (Tab 4.1).

	Mélange initial	Après 15 min d’incubation	Après 30 min d’incubation	Après 180 min d’incubation
% de liposomes restants	100 %	75 %	47 %	40 %
% de liposomes contrastés (par rapport au % de liposomes restants)	92 %	66 %	71 %	21 %

Table 4.1 Tableau comparatif de comptage de liposomes. On comptabilise ici les liposomes d’un diamètre plus important que 10 μm , les mesures étant réalisées par prélèvement de 4 μL de solution à tester, diluée dans 4 μL de solution extérieure.

Pour tenter de comprendre ce phénomène on a d’abord tenté d’estimer le nombre de lipides potentiels que l’on fixe sur un liposome. Dans notre protocole de polymérisation, on incube préalablement les liposomes dans une solution qui contient s-pVCA avant d’en prélever une partie pour la placer dans un milieu de polymérisation (cf Annexe A) contenant de l’actine-G. Ceci pour diminuer la quantité de s-pVCA en solution et diminuer le recrutement du complexe Arp2/3 en dehors de la membrane des liposomes. Les liposomes ont un rayon de l’ordre de la dizaine de microns, et en considérant que la surface occupée par un lipide est de l’ordre de 1 nm^2 , on trouve qu’il doit y avoir près d’un milliard de lipides sur la couche externe d’un liposome. Avec le mélange de lipides choisi (99% EPC – 1% en lipides biotinylés ; pourcentages molaires) il y a donc près de 10 millions de biotines disponibles.

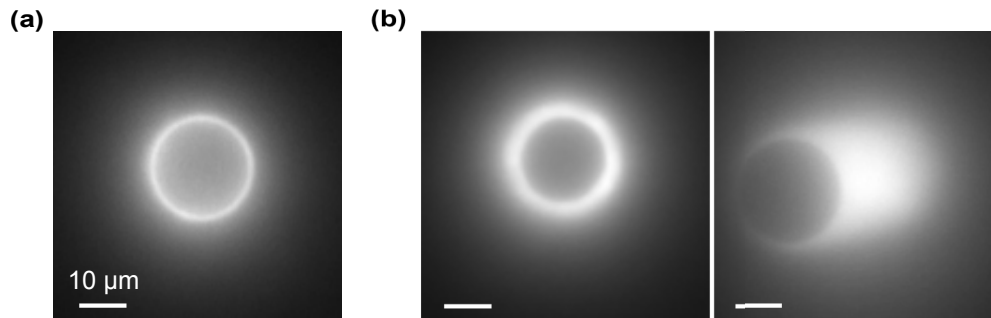
Dans l'expérience de tirage de tube à haute tension, ces liposomes doivent pouvoir s'accrocher à une bille streptavidinée. Il doit donc y avoir un excès de biotine par rapport à la streptavidine issue de s-pVCA, un excès d'autant plus large qu'une seule streptavidine est capable de se lier à quatre biotines.

Expérimentalement, j'ai travaillé à 100 nM de s-pVCA pour ce qui laisse (en considérant une concentration moyenne de 100 liposomes pour 4 μ L en sortie d'électroformation) $4 \cdot 10^{-15}$ mol de s-pVCA disponibles par liposome soit un peu plus de 2 milliards de molécules de s-pVCA. C'est a priori plus de 400 fois plus qu'il n'y a de sites biotines disponibles, mais il faut également tenir compte de la possibilité pour s-pVCA de ne pas s'accrocher à la membrane, la diffusion étant un phénomène aléatoire. Pour éviter que la polymérisation d'actine ne se produise en solution, cette étape dite d'incubation est suivie d'une dilution.

L'étude qui suit a été menée avec une concentration de 100 nM en s-pVCA, pour un temps d'incubation de 15 min. Le choix de ces deux valeurs s'est fait afin de minimiser le temps d'attente pendant l'expérience, tout en minimisant la quantité de s-pVCA résiduelle, non attachée à de la biotine, après incubation.

b) Observations de la polymérisation d'actine

Après l'incubation des liposomes dans le s-pVCA, on peut alors en prélever une partie pour les placer dans la solution de polymérisation (annexe A) et observer la polymérisation de l'actine. Toutefois, j'ai pu observer au cours de divers tests, que le cortex d'actine était différent selon l'ordre des ajouts dans la chambre d'observation. En plaçant dans la chambre d'observation les liposomes incubés (Fig 4.10), puis la solution d'actine (protocole A), j'ai ainsi pu observer des comètes sans capping protéine après 15 minutes de polymérisation, alors que je n'ai pas pu observer ce phénomène lorsque les liposomes étaient ajoutés en dernier (protocole B). Le protocole détaillé est décrit en annexe A.



Protocole A :

- Incubation s-pVCA
- Introduction des liposomes incubés dans la chambre
- Ajout de la solution de polymérisation
- Observation après 15 min

Protocole B :

- Incubation s-pVCA
- Ajout de la solution de polymérisation dans la chambre
- Introduction des liposomes incubés
- Observation après 15 min

Figure 4.10 Polymérisation d'actine à la surface externe de liposomes. Images en épifluorescence d'actine marquée par Alexa A-488. Mise en place des liposomes dans la chambre après la solution de polymérisation en a (protocole A), avant en b (protocole B).

Même s'il est difficile d'imaginer une explication à cette différence visible de polymérisation résultant de l'ordre dans la mise en place des éléments, notre intuition a été de penser que l'ordre d'ajout avait probablement influé sur l'architecture du réseau d'actine. Pour quantifier ces différences, j'ai mesuré l'intensité de la fluorescence $I(x)$ le long de rectangles ajustés au niveau du cortex (qui forment la couronne jaune de la figure) de dimensions (1 px, 25 px) comme le présente la Fig 4.11.

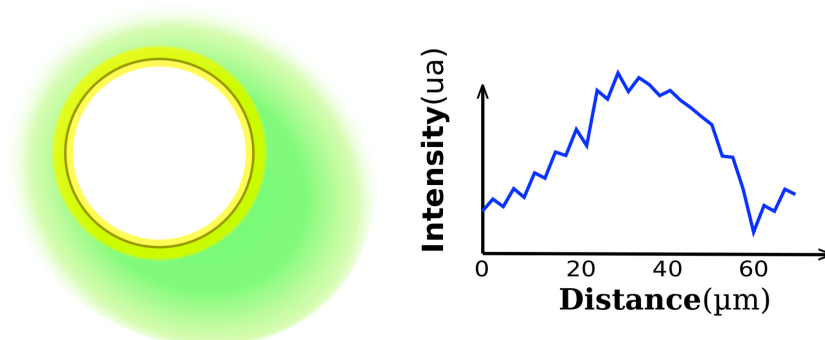


Figure 4.11 Présentation de la mesure de $I(x)$, l'intensité de la fluorescence de l'actine (en vert) le long d'un profil ajusté au cortex (en jaune).

Il est alors possible de calculer pour $I(\mathbf{x})$ issu du cortex de chaque liposome, son écart-type normalisé $\tilde{\sigma}_I$ défini par :

$$\tilde{\sigma}_I = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle} \quad Eq\ 4.18$$

Où σ_I est l'écart-type de $I(\mathbf{x})$ normalisé $\langle I \rangle$, sa moyenne. Pour les réseaux d'actine issus de la polymérisation selon le protocole A, et B on a ainsi:

$$\tilde{\sigma}_{I_A} = 0.050 \pm 0.037 \text{ et } \tilde{\sigma}_{I_B} = 0.14 \pm 0.086$$

Comme ici, la différence de mesure est due à l'absence de comètes après la polymérisation du protocole A, on a essayé de suivre la construction de ces réseaux depuis la mise en contact des liposomes avec l'actine-G.

c) Observation en continu

La méthode utilisée jusqu'à présent pour l'observation des liposomes consistait à placer une goutte de la solution à observer entre lame et lamelle séparées par un joint de graisse afin de ne pas écraser les liposomes (Fig 4.11). Comme une telle chambre est hermétique, il est compliqué d'y introduire l'actine-G pour suivre la polymérisation, après avoir pu observé les liposomes. L'observation des premiers instants de la polymérisation s'avère également complexe, vu que le photoblanchissement lié à l'utilisation de la lampe à mercure désassemble les filaments d'actine-F marqués par Alexa 488.

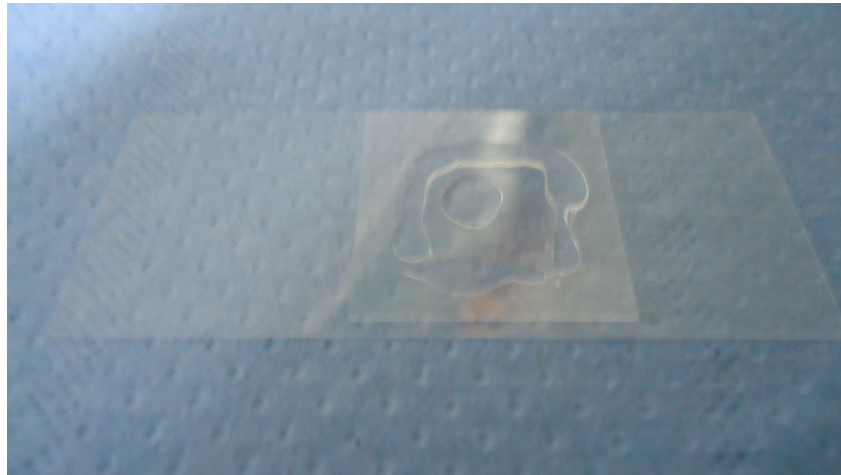


Figure 4.11 Echantillon prêt à être observé au microscope. Il est emprisonné entre lame et lamelle maintenues par une fine couche de graisse.

Pour étudier davantage l'action de s-pVCA à la surface des liposomes, et ensuite la polymérisation de l'actine par recrutement localisé du complexe

Arp2/3, nous avons essayé de mettre au point un montage permettant le suivi en continu d'un liposome au cours du temps. On a donc imaginé la construction d'une chambre différente, en remplaçant la graisse par de la paraffine (Fig 4.12), qui peut permettre des injections sans créer de flux trop importants pour suivre un liposome au cours du temps.

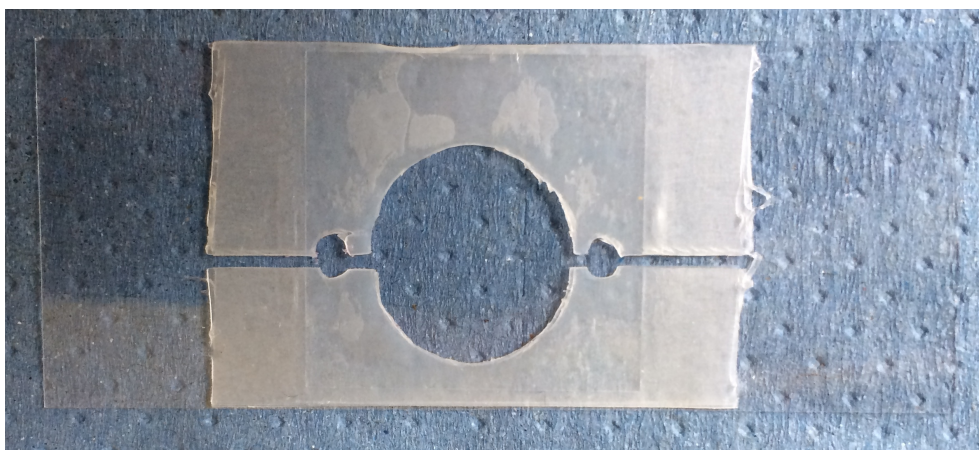


Figure 4.12 Chambre test pour l'observation en continu des liposomes. Les feuillets de paraffine sont découpés au scalpel puis l'ensemble (lame-paraffine-lamelle) est placé sous une masse de cuivre lourde, préalablement chauffée, pour maintenir l'assemblage prêt à l'emploi.

La chambre ainsi créée peut avoir toutes les formes souhaitées, mais pour pouvoir injecter le s-pVCA et ensuite les composants nécessaires à la polymérisation de l'actine, on a gardé cette forme pour avoir une entrée et une sortie. Les 'minis' chambres de part et d'autre de la chambre principale permettent de lutter contre l'évaporation de la solution, et les formes arrondies ont été préférées pour qu'il n'y ait pas de bulles d'air accrochées à la paroi intérieure. Finalement là encore, les flux engendrés par l'injection de nouveaux solvants étaient trop importants pour être capables de suivre un liposome au cours du temps. On a donc continué à observer les liposomes et la polymérisation de l'actine dans le même type de chambre que la Fig 4.11.

d) Etude des effets de la myosine VI sur la polymérisation d'actine

Pour tenter tout de même de mieux caractériser les différences entre les réseaux d'actine issus des protocoles *A* et *B*, on a observé la déformation engendrée par un moteur moléculaire particulier : la myosine VI. Cette protéine (introduite au chapitre I.3.c) est la seule myosine qui s'avance vers le bout pointu (-) d'un filament d'actine [Wells, 1999], ce qui dans notre système, signifie qu'elle avance vers la membrane du liposome. Elle est processive, tout en agissant seule, en tant que molécule isolée, ou en dimère. Elle est dans cette dernière configuration capable de se lier à deux filaments d'actine différents (un à chaque tête), et de les rapprocher. En ajoutant cette myosine (600 nM) au

sein du tampon de polymérisation dans les protocoles décrits ci-dessus, on espérait observer des évolutions différentes qui pourraient être quantifiées. Toutes ces expériences sont récapitulées Fig 4.13.

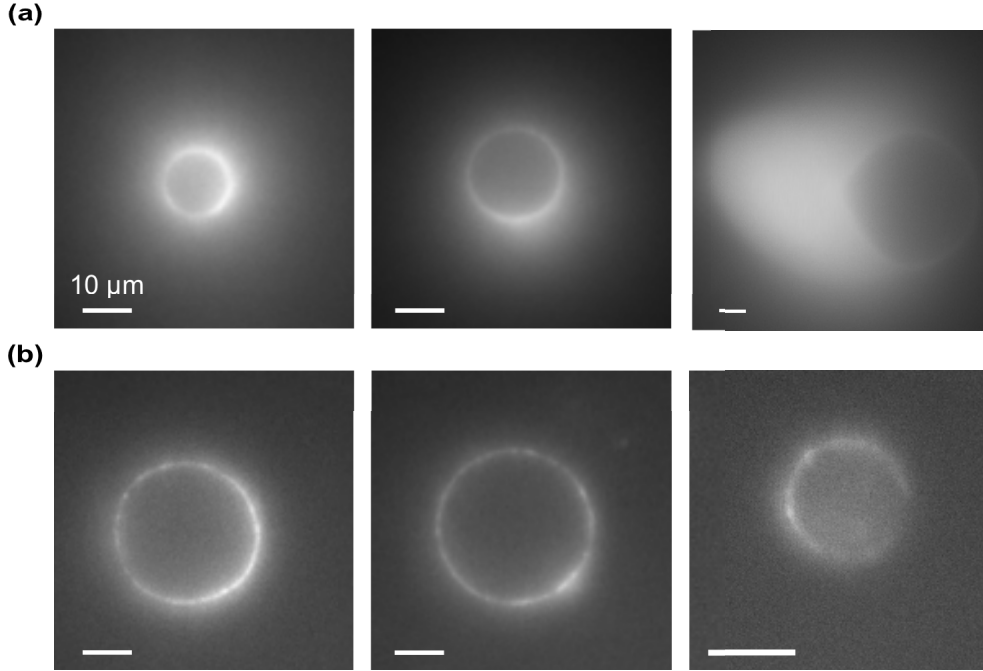


Figure 4.13 Polymérisation d'un cortex d'actine et de myosine VI à la surface externe de liposomes. Images en épifluorescence d'actine marquée par Alexa A-488. Mise en place des liposomes dans la chambre après la solution de polymérisation (contenant les myosines) en **a (protocole A), avant en **b** (protocole B).**

On observe d'abord que la myosine VI est bien active, puisqu'elle a un effet sur le cortex étudié précédemment : il y a des comètes lors de l'application du protocole A, cette brisure de symétrie étant le signe de l'augmentation de la tension au sein du cortex d'actine [Carvalho, 2013b], et il y a formation de 'points de concentration d'actine-F' sur le cortex obtenu à partir du protocole B. On peut de nouveau calculer les écarts-types normalisés pour chacun de ces protocoles :

$$\tilde{\sigma}_{I_A} = 0.20 \pm 0.12 \text{ et } \tilde{\sigma}_{I_B} = 0.041 \pm 0.018$$

On obtient donc de larges modifications lorsque le réseau d'actine se construit dès le début de sa formation en présence de la myosine VI. Comme la construction d'un tel cortex prend 15 minutes, on peut se demander quel est l'effet de l'ajout de la myosine VI à la fin de la polymérisation (Fig 4.14). Concrètement, il s'agit de reprendre les réseaux issus des protocoles A et B sans myosine, et de rajouter après 15 minutes de polymérisation d'actine sans myosine, la myosine VI (pour avoir 600 nM *in fine* en solution). Les résultats suivants sont observés après un temps d'évolution de 10 minutes.

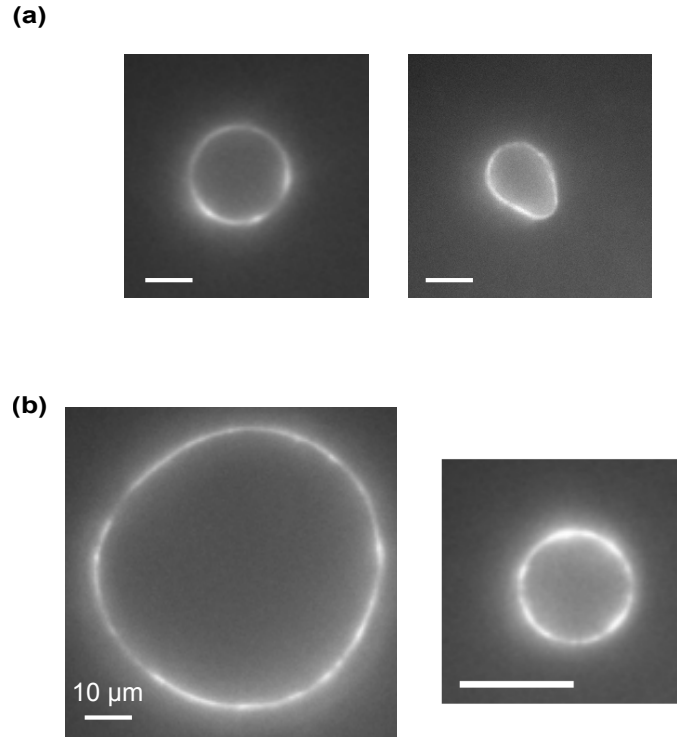


Figure 4.14 Polymérisation d'un cortex d'actine et de myosine VI à la surface externe de liposomes. Images en épifluorescence d'actine marquée par Alexa A-488. Mise en place des liposomes dans la chambre après la solution de polymérisation en **a** (protocole *A*), avant en **b** (protocole *B*), et enfin après 10 minutes, ajout de solution de polymérisation contenant la myosine VI.

Pour analyser ces images, on peut à nouveau faire appel à la notion d'écart-type normalisé, soit, pour chacun des protocoles :

$$\tilde{\sigma}_{I_A} = 0.057 \pm 0.011 \text{ et } \tilde{\sigma}_{I_B} = 0.043 \pm 0.015$$

Ces images se ressemblent davantage, en terme d'inhomogénéité de fluorescence (granulosité), et cette ressemblance se retrouve ici dans l'analyse de la fluorescence issue du cortex.

e) Discussion

Le fait de placer dans la chambre d'observation les liposomes (incubés avec s-pVCA) ou la solution de polymérisation (décrite en annexe A) en premier, se révèle avoir une importance sur l'organisation du cortex d'actine à la surface extérieure des liposomes. Il est possible d'accentuer les différences en ajoutant de la myosine VI dès le début (*ab initio*) de la formation du cortex. A l'inverse, son action sur des réseaux initialement inégaux (*in fine*) tend à gommer les différences (Fig 4.15).

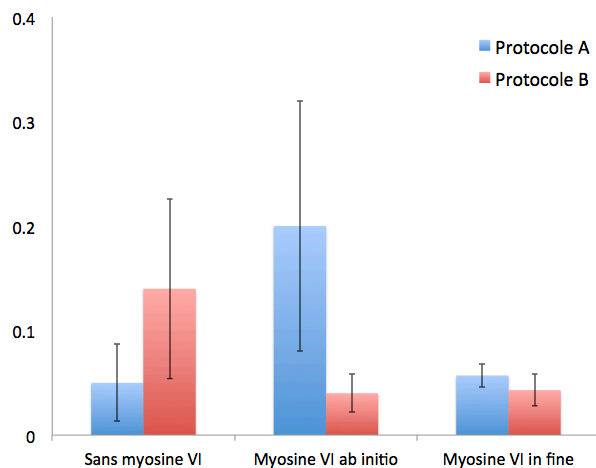


Figure 4.15 Etude de l'écart-type normalisé pour différents protocoles de polymérisation. Dans l'ordre, $N = 15, 16, 19, 18, 20, 20$.

Dans le protocole *A*, les liposomes sont ajoutés après la solution de polymérisation, expérimentalement, cela signifie qu'ils sont ajoutés sur une goutte déjà formée. Ils doivent donc tomber jusqu'au fond de la chambre pour être observés. Dans le protocole *B*, c'est l'inverse, mais le volume rajouté (la solution de polymérisation) est bien plus important (10 fois plus) que la goutte initiale. Il y a donc plus de flux dans ce dernier cas.

Je pense que dans le cas *A*, les liposomes sont mis en contact avec la solution de polymérisation plus lentement qu'en *B*, où les courants d'entraînement liés à l'injection d'un large volume priment sur les courants de diffusion. Cela expliquerait le retard (dans le cas sans myosine) dans l'augmentation de la tension au sein du cortex de *A* (absence de comètes) sur *B* (comètes nombreuses). Lors de l'ajout de la myosine VI *ab initio*, celle-ci diffusant plus lentement que l'actine-G ou que le complexe Arp2/3, il se pourrait que dans le cas *A*, un réseau homogène et connexe ait le temps de se former avant son arrivée, ce qui aurait pour effet d'augmenter rapidement la tension corticale, aboutissant à la rupture de symétrie observée. Dans le cas *B*, la myosine VI pourrait contracter le réseau trop tôt, c'est-à-dire avant qu'il y ait continuité du cortex, ce qui aboutit à la formation de 'points de concentration d'actine-F'.

Le dernier cas, c'est-à-dire quand la myosine VI est ajoutée *in fine*, est assez surprenant car on ne retrouve pas dans la solution des liposomes avec comètes (alors que l'on est sûr qu'ils se sont formés au moins dans le cas *B*). En fait on trouve des liposomes à nu (que je n'ai pas pris en compte dans les statistiques, mais qui auraient contribué à faire chuter $\tilde{\sigma}_I$), avec un petit point de fluorescence très intense ('peeling' comme sur la Fig 4.16).

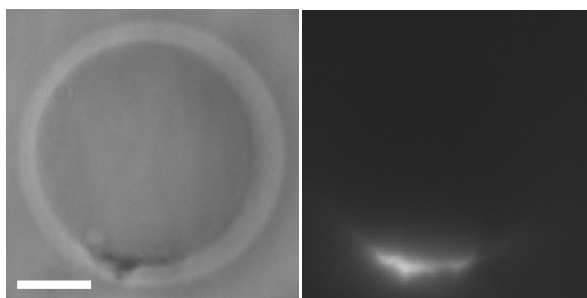


Figure 4.16 Images d'un liposome (contraste de phase, fluorescence de l'actine A-488) suspecté d'avoir eu une comète d'actine, avant que la myosine VI ne la contracte.

Finalement, même s'il est incertain de s'avancer sur une explication entre ces différences de réseaux, ces expériences montrent l'importance des moindres détails dans la reconstruction d'un cortex d'actine.

3) Conclusion

Au cours de ce chapitre, on a pu reprendre en partie la démarche du chapitre III, mais cette fois à partir de tubes basse tension. On a mis au point un montage expérimental et en particulier une méthode d'observation du suivi des chemins de tube pour avoir accès à la force de maintien de ce type de tube. Je n'ai malheureusement pas pu observer la polymérisation de l'actine sur un tube basse tension, à cause de l'activateur s-pVCA, capable de recruter le complexe Arp2/3, mais aussi de tendre la membrane ce qui rend impossible le tirage de tube dans ce cas. J'ai alors tenté différents procédés pour reproduire *in vitro* la polymérisation d'actine. Ces essais se sont révélés concluants, malgré les effets indésirables de l'incubation de s-pVCA sur les liposomes (augmentation de la tension, perte de contraste des liposomes). En poursuivant l'étude de la polymérisation d'actine, j'ai pu une dernière fois me rendre compte de l'extrême sensibilité de ce type de système biomimétique.

Conclusion générale

J'ai utilisé une grande partie de ces trois années de thèse à mettre au point le montage optique pour l'analyse, à l'aide de la QPD, de la déviation du faisceau laser à l'origine de la pince optique, récompensé par la satisfaction de trouver petit à petit le bon alignement des différents éléments. Nous avons pu obtenir des mesures de forces satisfaisantes, reproductibles, en un mot : fiables.

Ces mesures se sont révélées offrir de nouvelles possibilités, de par l'utilisation de plusieurs techniques profitant des spécificités de notre dispositif. 'Smart scan', pour la calibration de la QPD, et mesures de la PSD *in situ* m'ont permis de considérer chaque bille indépendamment. Nous avons alors accédé à des comparaisons très fines des comportements d'une même bille en situation libre puis attachée à un nano-tube à haute tension. On a ainsi caractérisé pour la première fois les fluctuations de ce type de nano-tube de membrane et confronté ces mesures à un modèle. Même si plusieurs aspects (augmentation du ratio à haute fréquence, différence de comportement selon l'axe d'observation) restent à interpréter.

Nous avons également réussi à obtenir des tubes de membrane détendue, à basse tension. Sans la mesure de force par l'observation de la déviation du faisceau par une bille, nous avons pu suivre les déformations d'un tube basse tension et décrire théoriquement ces fluctuations de tube à l'aide d'un modèle de corde simple.

J'ai enfin été confronté à un problème de taille : l'augmentation de la tension par s-pVCA, la protéine utilisée dans notre équipe pour recruter le complexe Arp2/3 et déclencher la polymérisation d'actine. Pour tenter de mieux comprendre l'augmentation de tension et pour essayer de la contrer, j'ai étudié la dynamique de polymérisation seule. Et je me suis une dernière fois rendu compte de l'extrême sensibilité des expériences de biochimie, où l'ordre d'ajout des différents éléments à l'origine de la polymérisation d'actine a une très grande influence sur l'architecture du réseau du cortex d'actine obtenu *in fine*.

Finalement, j'ai pu mettre en place un système de mesures de force performant, qui m'a non seulement permis d'accéder à des résultats originaux sur la fluctuation de nano-tubes de membrane, mais qui permettra aussi d'étudier le rôle de la polymérisation d'actine sur ces nano-tubes.

Annexes

Sommaire :

A- Solutions tampons

B- Protocole d'électroformation

C- Calibration de la QPD (Code)

D- Calcul de la PSD (Code)

E- Ajustements de la PSD (Code)

F- Analyse d'image (Code)

G- Article

H- Etude théorique des PSDs (Pierre Sens)

I- Calcul de l'amplitude des fluctuations d'une corde tendue

J- Formations Ecole Doctorale – Physique Île de France

K- Revue

Annexe A

Solutions tampons

Solution intérieure :

Cette solution d'électroformation, qui va finir par être contenue à l'intérieur des liposomes se doit de comporter peu de sel. Dans de l'eau distillée, on compte :

- 20 mM HEPES (pH 7)
- 100 mM sucrose
- (- 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de sulforhodamine B)

Ce dernier composant n'a été utilisé que dans les expériences où le contraste de phase n'était pas suffisant pour déterminer les rayons du liposome / de la micropipette utilisés. Le pH est contrôlé à 7 après mélange.

Solution extérieure :

C'est la solution qui permet à la fois de diluer la solution intérieure après électroformation, ce qui a l'avantage de diluer la sulforhodamine à l'extérieur et ainsi d'augmenter le contraste des liposomes, et à la fois de rendre possible la polymérisation d'actine-G en actine-F (avec la présence des sels nécessaires et de l'ATP). Dans de l'eau distillée, il se compose de :

- 10 mM HEPES (pH 7)
- 50 μM CaCl_2
- 1 mM DTT (dithiothreitol)
- 0.5 mM DABCO (diazabicyclo[2,2,2]octane)
- 2 mM MgCl_2
- 5 mM ATP
- 50 mM KCl
- 70 mM glucose

L'ajustement du pH de cette solution est effectué sur glace (pour ne pas que l'ATP soit dégradée) à 7. L'osmolarité est réglée à l'aide du glucose, par rapport à la mesure de solution intérieure (+ 30 mOsm.L⁻¹) pour obtenir des liposomes détendus ('floppys').

Solution tampon actine-G :

Pour partir d'actine-G dans nos expériences, on part d'une poudre lyophilisée d'actine-F que l'on dilue dans ce tampon et que l'on abandonne sur glace au moins une nuit avant toute utilisation, pour que l'actine se désassemble entièrement en actine-G. Dans de l'eau distillée, on trouve :

- 2 mM TRIS
- 0.2 mM CaCl₂
- 0.2 mM ATP
- 0.2 mM DTT

Le pH est ajusté entre 7.5 et 8, pour favoriser l'actine-G. L'osmolarité est ajustée pour correspondre le plus possible à celle de la solution extérieure.

Protocole de polymérisation :

C'est un protocole qui se déroule en deux étapes, et pour lequel on se doit de respecter les temps de préparation :

Incubation des liposomes (15 min) :

- Dilution d'un volume de liposomes (en sortie d'électroformation, donc dans la solution intérieure) dans 10 volumes de solution extérieure.
- 175 nM s-pVCA

Solution de polymérisation (à préparer à la dernière minute) :

Dans la solution extérieure, on trouve

- 3 µM d'actine (à 20 % molaire A-488)
- 3 µM profiline
- 50 nM Arp2/3

Polymérisation :

Mise en contact d'un volume de liposomes incubés dans 10 volumes de solution de polymérisation. L'observation se fait 15 minutes après la mise en contact.

Solution d'injection :

C'est la solution présente dans la micropipette d'injection, qui se doit d'être proche de la solution extérieure pour ne pas créer de flux lors de l'injection, et qui se doit de conserver l'actine sous sa forme globulaire. Dans de l'eau distillée, on place :

- 10 mM HEPES (pH 7)
- 1 mM CaCl_2
- 1 mM DTT (dithiothreitol)
- 0.5 mM DABCO (diazabicyclo[2,2,2]octane)
- 1 mM MgCl_2
- 140 mM glucose

Le pH de cette solution est ajusté à 7. Son osmolarité est réglée pour correspondre le plus possible à celle de la solution extérieure.

Annexe B

Protocole d'électroformation

Pour obtenir des liposomes, j'ai suivi ce protocole d'électroformation :

- La première étape est le dépôt sur deux plaques conductrices en verre recouvertes d'I.T.O. (Indium Tin Oxyde) de 10 μL d'un mélange de lipides (en terme de ratio molaire : 99 % EPC L- α -phosphatidylcholine – 1% lipides biotinylés, dissous à 2.5 g.L^{-1} dans un mélange chloroforme – éthanol à 5/3 en volume) à l'aide d'une seringue Hamilton.
- Ce film est ensuite séché sous vide pendant deux heures pour que le solvant s'évapore.
- On assemble ensuite la cellule d'électroformation (schéma Fig B.1) en plaçant face à face les deux plaques, espacées et colmatées par de la pâte en vitrex. On remplit ensuite la cellule avec la solution intérieure (décrite en annexe A) qui sera encapsulée dans les liposomes.

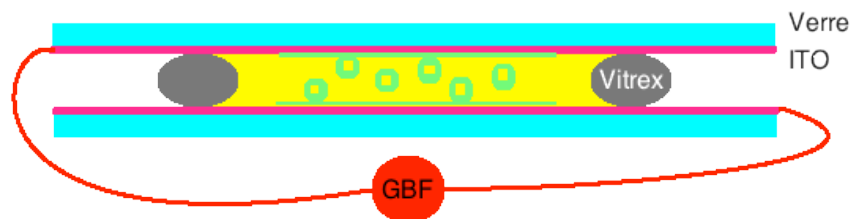


Figure B.1 Schéma de liposomes en cours d'électroformation. On remarque que le gonflement du film de lipides (en vert) permet l'encapsulation de la solution intérieure (en jaune).

- Un courant électrique alternatif sinusoïdal (10 Hz, 2.3 V pic à pic) appliqué pendant une nuit entre les deux plaques permet aux lipides de s'arranger en liposomes.
- Ces liposomes sont ensuite décollés par roulement d'une bulle d'air entre les deux plaques, puis collectés avec soin à l'aide d'une micropipette. Ils se conservent alors une semaine dans un tube Eppendorf gardé à 4°C.

Annexe C

Calibration de la QPD (Code)

Pour calibrer la diode quatre quadrants (QPD) qui sert d'appareil de mesure, il suffit de déterminer le coefficient directeur du régime linéaire de $V_{QPD}(d)$. Toutefois, comme les billes utilisées pour les expériences de tirage de tubes ont un diamètre ($3.05\text{ }\mu\text{m}$) plus grand que la longueur d'onde du faisceau laser utilisée (1064 nm), il arrive assez régulièrement que la courbe présente un changement de pente au voisinage de $d = 0$ (Fig C.1).

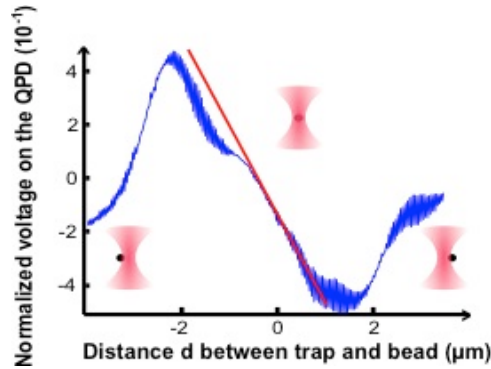


Figure C.1 Courbe de calibration de la QPD brisée.

S'il est impossible d'utiliser les courbes qui présentent un plat pour calibrer le système puisqu'il pourrait y avoir une ambiguïté (plusieurs tensions différentes correspondraient à une même distance d) ; la courbe présentée reste utilisable tant que l'on vérifie que les déplacements de la bille s'effectuent dans la partie linéaire. La bille, lorsqu'elle va être attachée au tube de membrane, va subir une force qui va la décaler du côté des tensions négatives mesurées sur la QPD (cf schéma linéarité du III). Pour ces raisons, j'ai choisi de mesurer le coefficient de linéarité entre le point au centre des deux extrema de la courbe et le point situé au bout du régime linéaire (numériquement fixé à 85 % de la distance entre le maximum de la courbe et le minimum). Cela permet d'aboutir à la droite rouge (Fig C.2).

Le code Matlab suivant effectue toutes ces opérations de calcul.

```
function [slope] = Fabslope(xscan)
% objectif trouver le coefficient de linéarité (appelé slope) de
manière automatique :
% xscan est la data brute issue du programme Labview

% Normalisation du signal de la QPD sur l'axe x par l'intensité
totale recue sur l'ensemble de la QPD :
A = xscan(4,:)./xscan(8,:);

% Détermination des extrema de la fonction :
minxx = find(A == max(A(70:150)));
maxxx = find(A == min(A(150:230)));

% fit linéaire sur la partie intéressante :
minx = floor((maxxx + minxx)/2);
maxx = floor(minx+0.7*(maxxx - minxx)/2);
lin = fittype('alpha*x+beta', 'independent', 'x');
foption = fitoptions(lin);
foption.StartPoint = [-0.5,12];
fitlin = fit(xscan(1,minx:maxx)', A(1,minx:maxx)',lin,foption);
param = coeffvalues(fitlin);
alpha = param(1);
beta = param(2);
% Mesure de VRMSI (Voltage Root Mean Square Value Intermediate):
% C'est ce qui va nous permettre de calculer l'écart relatif entre
les courbes (brut et fit).
VRMSI = 0;
longueur = size(xscan(1,:));
for i = 1:longueur(2);
    VRMSI = VRMSI + (xscan(4,i)./xscan(8,i))^2;
end
VRMSI = sqrt(VRMSI/(longueur(2)-1));

% Ecart entre Fit et courbe :
ecart(1,:) = abs(xscan(4,:)./xscan(8,:)-
(alpha*(xscan(1,:))+beta))/VRMSI;

% dessin pour vérifier le fit :
hold off
plot(xscan(1,:),xscan(4,:)./xscan(8,:), 'b');
hold on
plot(xscan(1,:),ecart(1:,:), 'green');
plot(xscan(1,minx:maxx), alpha*xscan(1,minx:maxx)+beta, 'r');
plot(xscan(1,:), alpha*(xscan(1,:))+beta, 'black');
axis([12 20 -0.7 0.6]);

% Renvoi de la mesure du coefficient linéaire :
slope = alpha;
end
```

Annexe D

Calcul de la PSD (Code)

Le calcul de la PSD s'effectue en enregistrant les positions de la bille sur un temps fini. Le taux d'échantillonnage va délimiter la fréquence de Fourier maximale, et l'inverse de la durée d'enregistrement la fréquence de Fourier minimale.

Dans un premier temps, on calcule la PSD discrète à l'aide de ce code (écrit par T. Betz) :

```
function [f, Pyy_out, T]=power_sd(data, srt)
%calclates the psd using the data and the sampling rate srt in Hz.

p=length(data);
low_f=srt/p;

fNyq    =    srt / 2;
delta_t =    1 / srt;

Y = fft(data,p);
Pyy = Y.* conj(Y) / (p*srt);

f=srt/p*( [0:p/2] );
Pyy_out=Pyy(1:p/2+1);
```

On obtient alors ce type de courbe :

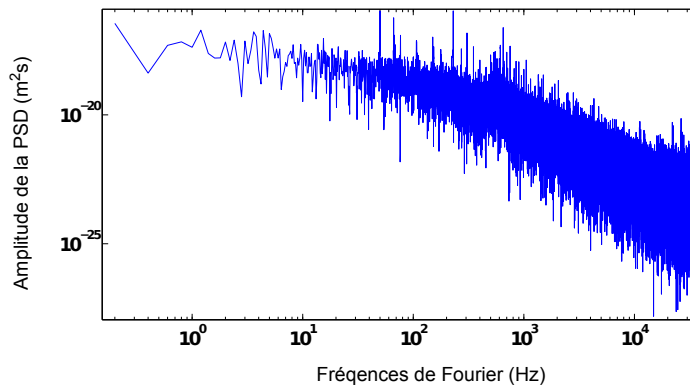


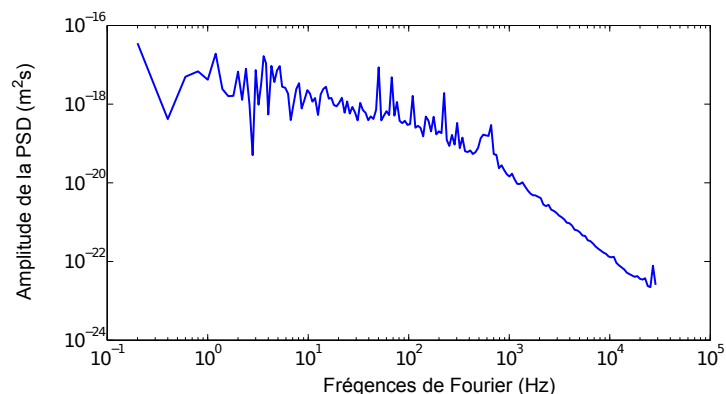
Figure D.1 PSD obtenu à partir de données brutes.

On aimerait pouvoir moyenner cette courbe (pour se débarrasser de ce bruit à haute fréquence), mais le poids de chaque élément de courbe est très différent, puisqu'il y a de plus en plus de points qui compose la courbe à mesure que la fréquence augmente. On doit alors regrouper ces points sur des tailles de fenêtres de plus en plus grandes, ce que fait la fonction matlab suivante :

```
function [x,y,x_,y_,yf]=log_binning(x_in,y_in,final_length)
%This function converts the input data, x_in, y_in in a log smooth
version, by calculation averages of exponentially increasing bin
size. The final length of the output will be tried to adjust to
final_length. However, since there is a big chance that the low
values will not allways fall into this scheme it might be smaller
f_m=length(x_in);
up=log10(f_m);
interm=[-(up-up/final_length):up/final_length:0]+(up-
up/final_length);
bdr=round(10.^(interm));
%This ensures that the last value will also be taken into account,
%since in the for loop we substract 1
bdr(length(bdr))=bdr(length(bdr))+1;
n=0;
k=1.5;
for i=2:length(bdr)
    if bdr(i-1)<bdr(i)
        n=n+1;
        part=[bdr(i-1):bdr(i)-1];
        x(n)=sum(x_in(part))/length(part);
        x_(n)=median(x_in(part));
        y_std(n)=std(y_in(part));y_m=mean(y_in(part));
        %look for the values that are k time the std away from the
        center, and kill them
        y(n)=sum(y_in(part))/length(part);
        y_(n)=median(y_in(part));
        int=find(y_in(part)>y_m+k*y_std(n));
        if length(int)>0
            end
            part(int)=[];
            yf(n)=mean(y_in(part));
        end
    end
end
```

On obtient alors une PSD plus facile à représenter (et surtout à ajuster) :

Figure D.2 PSD
« moyennée »



Finalement, il ne reste plus qu'à éliminer les pics sur ces PSDs qui sont dûs à une mauvaise isolation électrique du montage / ou à divers bruits (thermique, métro ...). On obtient alors une PSD telle que celles présentées dans ce manuscript. Toutefois, j'ai volontairement tronqué les PSDs présentées dans le manuscrit entre 10 et 10 kHz. En effet, très peu de points participent à la courbe à basse fréquence (à cause de la moyenne par taille de fenêtre variable), et visuellement c'est la partie la plus visible sur une courbe log-log. Pour les hautes fréquences, on atteint à 10 kHz les limites du dispositif de mesure (pour la QPD – le temps de traitement des données pour Labview), d'où la coupure.

Annexe E

Ajustement de la PSD (Code)

L'ajustement de la PSD (densité spectrale de puissance – power spectral density) est capital dans les expériences de mesure de force. Cela permet non seulement de calibrer la constante de raideur du piège optique (k_{trap}), mais dans le cas des mesures plus fines (fin du III), cela donne accès à la mesure des différences entre les statuts de la bille : ‘libre’ ou ‘attachée’.

Il y a plusieurs difficultés à un bon ajustement de ces mesures de PSD : d'une part, les valeurs de la PSD s'étalent sur plusieurs ordres de grandeur (généralement entre 10^{-18} et 10^{-23} m².s), il y a une inégalité de répartition des points (il y a davantage de points à haute fréquence ce qui déséquilibre le poids de chaque régime dans le fit global de la PSD), et enfin les faibles valeurs de la PSD sont à l'origine de soucis pour Matlab.

J'ai donc choisi de séparer le fit de la fonction PSD en deux parties. D'abord en regardant la partie haute fréquence (entre 1 et 10 kHz), qui a l'avantage d'être la partie de la courbe de la PSD qui possède une dépendance simple en f^{-2} , et s'écrit donc comme $PSD(f) = A f^{-2}$, correspondant à un régime visqueux de la bille, il est facile d'extraire le pré-facteur A. Ensuite, en regardant la partie basse fréquence (entre 10 et 200 Hz) : soit je recherche une calibration de la bille et du coup à partir de l'équation de la PSD théorique (Eq 2.7 réécrite plus bas), il est possible d'extraire k_{trap} en ajustant ce modèle aux données, soit je recherche l'exposant à basse fréquence caractéristique de la PSD qui s'écrit alors $PSD(f) = B f^\alpha$.

$$PSD(f) = \frac{\|\tilde{d}(f)\|^2}{T_{exp}} = \frac{1}{T_{exp}} \times \frac{\|\tilde{r}\|^2 / k_{trap}^2}{1 + f^2 / f_c^2}, \quad f_c = \frac{k_{trap}}{12\pi^2 \eta r_{bead}} \quad Eq\ 2.7$$

Pour ces deux types d'ajustement, voici les codes Matlab que j'ai utilisé.

Code pour obtenir k_{trap} :

```
function [ PSDfit, fc, k ] = fitFabrice( f , psd )
% Objectif : fitter la PSD par une lorentzienne, et retourner en
% particulier la fréquence de coupure fc du filtre passe bas, et aussi
% la raideur du piège k.
% on connaît quelques paramètres physiques pour le système :
r_bead = (3.05e-06)/2;      % rayon de la bille
pi = acos(-1); % Pi
eta = 0.001; % viscosité de l'eau (pour Stokes)

% Paramètres de fit :
f_min = 10; % Fréquence minimale à partir de laquelle le fit est
% fait (trop de bruit avant)
f_max = 10000; % Fréquence maximale pour le fit (limité par le
% détecteur - QPD)
f_crit = 1000; % Fréquence à partir de laquelle le régime visqueux
% domine

% Pour rappel, on cherche à fiter une fonction de la forme
% A/(1+(f/fc)^2)
% Pour la première étape du fit, on peut évaluer avec précision ce
% qu'il se passe sur le régime visqueux pour f entre f_crit et f_max.
l = size(f);
fpart = [];
psdpart = [];
j = 0;
fm = l(2);

for i = 1:l(2);
    if (f(i)> f_crit) && (f(i) < f_max)
        j = j+1;
        fpart(j) = f(i);
        psdpart(j) = psd(i);
    end
end

% on peut en effet fiter la partie visqueuse par un loi en alpha/f^2
% le fit ne peut pas se faire directement car on est en dessous de la
% précision de Matlab (<eps). On est donc forcé de décaler la courbe
% vers une zone dans laquelle le fit pourra converger.
powerlaw = fittype('alpha*freq^(-2)', 'independent', 'freq');
foption = fitoptions(powerlaw);
foption.TolX = 1e-10;
foption.Tolfun = 1e-10;
foption.StartPoint =
10e20*psdpart(floor((1+j)/2))*(fpart(floor((1+j)/2))^2);
fitvisq = fit(fpart',10e20*psdpart',powerlaw,foption);
alpha = coeffvalues(fitvisq)/(10e20);

% Maintenant que l'on connaît la partie visqueuse, on peut regarder
% ce qu'il se passe dans les régions 'plus bruitées' en essayant de
% fiter directement une lorentzienne :

fpart = [];
psdpart = [];
j = 0;

for i = 1:l(2);
```

```

    if (f(i) > f_min) && (f(i) < f_max)
        fm = min(i, fm);
        j = j+1;
        fpart(j) = f(i);
        psdpart(j) = psd(i);
    end
end
% Pour que le fit se fasse correctement, on est obligé de déporter la
% courbe vers des valeurs plus proches de 10^0, toujours par souci de
% précision sur Matlab (Tolérance > eps)
lorentz = fitttype('1e8*(freqc^2+freq^2)^(-1)', 'independent',
'freq');
foption = fitoptions(lorentz);
foption.TolX = 1e-10;
foption.Tolfun = 1e-10;
foption.StartPoint = 400;
adjust=(f_crit^(-2));
fitlorentz = fit(fpart', 1e8*((alpha)^(-1))*psdpart', lorentz, foption);
fc = coeffvalues(fitlorentz);

% On peut réécrire la PSD fitée recherchée !
fpart = [];
psdpart = [];

for i = fm:j+fm;
    fpart(i) = f(i);
    psdpart(i) = alpha/(fc^2+fpart(i)^2);
end

PSDfit = psdpart;
k = 2*pi*fc*6*pi*eta*r_bead;

end

```

Code pour obtenir α l'exposant à basse fréquence :

```

function [ f_fit, PSDtronc, PSD_fit_constante,
PSD_fit_fixed, PSD_fit_power, power ] = Fabfitintermediaire( fmin,
fmax, f, PSD )
% fonction qui aboutit au fit de la puissance à basse fréquence
% On ne regarde que la partie que l'on souhaite fitter :
l = size(f);
j = 1;
for i = 1:l(2)
    if (fmin < f(i)) && (fmax > f(i))
        f_fit(j) = f(i);
        PSDtronc(j) = PSD(i);
        j = j+1;
    end
end
% premier fit (le plus simple) : on fit par une constante :
constante = fitttype('alpha*freq^0', 'independent', 'freq');
foption = fitoptions(constante);
foption.TolX = 1e-10;
foption.Tolfun = 1e-10;
foption.StartPoint = 10e20*PSDtronc(floor((1+j)/2));
fitconstante = fit(f_fit', 10e20*PSDtronc', constante, foption);
alpha = coeffvalues(fitconstante)/(10e20);
% second fit : on regarde en prenant une puissance de -1 :
fixedpower = fitttype('beta*freq^(-1)', 'independent', 'freq');

```



```

foption = fitoptions(fixedpower);
foption.TolX = 1e-10;
foption.Tolfun = 1e-10;
foption.StartPoint =
10e20*PSDtronc(floor((1+j)/2))*f_fit(floor((1+j)/2));
fitfixedpower = fit(f_fit',10e20*PSDtronc',fixedpower,foption);
beta = coeffvalues(fitfixedpower)/(10e20);
% dernier fit : on regarde en laissant libre la puissance :
freepower = fitttype('gamma*freq^(delta)', 'independent', 'freq');
foption = fitoptions(freepower);
%foption.TolX = [1e-10,1e-10];
%foption.Tolfun = [1e-10,1e-10];
foption.StartPoint = [-0.5,beta];
fitfreepower = fit(f_fit',10e20*PSDtronc',freepower,foption);
coeffvalues(fitfreepower);
result = coeffvalues(fitfreepower);
gamma = result(2)/(10e20);
delta = result(1);

% Conservation des Datas :
for k = 1:j-1
    PSD_fit_constante(k) = alpha;
    PSD_fit_fixed(k) = beta/f_fit(k);
    PSD_fit_power(k) = gamma*(f_fit(k))^(delta);
end
hold off
loglog(f_fit,PSD_fit_fixed,'red');
hold on
loglog(f,PSD,'black');
loglog(f_fit,PSD_fit_constante,'blue');
loglog(f_fit,PSD_fit_power,'green');
power = delta;

end

```

Annexe F

Analyse d'image (Code)

Pour analyser de façon méthodique et toujours de la même façon les rayons des liposomes ainsi que les rayons des micropipettes utilisées, j'ai réalisé pour chaque expérience de tirage de tube une image en fluorescence (verte) (cf Fig F.1). On y distingue facilement l'intérieur du liposome puisqu'il contient de la sulforhodamine B, ce qui permet une visualisation également de l'intérieur de la micropipette. Cette méthode est ici avantageuse, car la même image en lumière blanche laisse le doute quant à la localisation exacte des rayons intérieurs du liposome r_l et de la micropipette r_m .

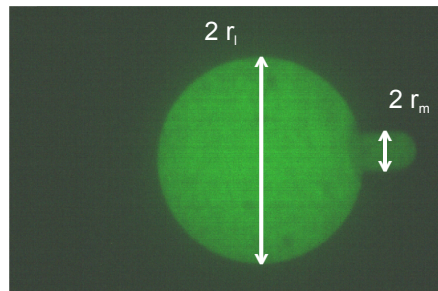


Figure F.1 Image d'un liposome en fluorescence (Sulforhodamine) à la base du traitement d'image décrit ici.

La macro imageJ développée ci-dessous détaille comment à partir de ce type d'image en fluorescence je peux accéder aux rayons intérieurs.

```
macro "mesure diametre" {  
  
    // Chargement des images  
    path = File.openDialog("Select a File");  
    dir = File.getParent(path);  
    name = File.getName(path);  
  
    // Changement de contraste pour faire apparaître plus clairement les  
    contours pour l'observateur :  
    run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");  
    // Sélection de la zone d'intérêt :  
    setTool("rectangle");  
    title = "Selection";
```

```

msg = "Selection large du liposome et du tube centrés puis OK";
waitForUser(title, msg);
getSelectionBounds(xzone, yzone, widthzone, heightzone);
run("Mean...", "radius=16");
run("Select None");

// Sélection de la portion du liposome pour en mesurer le diamètre
title = "Liposome";
msg = "Selection d'une portion pour mesurer le diamètre";
waitForUser(title, msg);
getSelectionBounds(x, y, width, height);

// Ré-ouverture de l'image pour travailler sur des datas brutes (sans
l'augmentation de contraste) :
close();
open(path);

// Balayage le long du rectangle établi
lipodiam = newArray(width);
ydessin = height;
for (xi = x ; xi < x + width ; xi++) {
    makeLine(xi, y, xi, y+height );
    Profile = getProfile();
    // sur cette courbe on doit trouver 2 points d'inflexion :
    // le premier doit être dans la première moitié
    // on définit une dérivée 'moyenne' sur 8 points :
    infl1=0;
    xinfl1=0;
    for (i=5; i<(height-1)/2; i++) {
        infli = ((Profile[i+4] + Profile[i+3] + Profile[i+2] +
Profile[i+1]) - (Profile[i-4] + Profile[i-3] + Profile[i-2] +
Profile[i-1]))/20;
        if (infli>infl1) {
            infl1 = infli;
            // on cherche le max de la
            // dérivée
            xinfl1 = i;
            // pour garder sa position
        }
    }
    if (xinfl1<ydessin) {
        ydessin = xinfl1; // lieu pour le dessin de la
        // taille représentative
        xdessin = xi;
    }
    // le second doit être dans la dernière moitié
    infl2=0;
    xinfl2=0;
    for (i=height-4; i>height/2; i--) {
        infli = ((Profile[i+4] + Profile[i+3] + Profile[i+2] +
Profile[i+1]) - (Profile[i-4] + Profile[i-3] + Profile[i-2] +
Profile[i-1]))/20;
        if (infli<infl2) {
            infl2 = infli;
            // on cherche le max de la
            // dérivée
            xinfl2 = i;
            // pour garder sa position
        }
    }
    lipodiam[xi-x] = xinfl2-xinfl1;
}
// on va conserver les 9 valeurs les plus élevées et en prendre la
médiane (pour écarter les valeurs extrêmes)
lipodiam = Array.sort(lipodiam);
// On choisit la médiane des 9 dernières valeurs :

```

```

print("Le diamètre de ce liposome est de",lipodiam[width-
5],"pixels.");

// Affichage du résultat
close();
open(path);
makeRectangle(xdessin,y+ydessin,4,lipodiam[width-5]);
run("Clear", "slice");
Dialog.create("Liposome");
Dialog.addMessage("Le diamètre du liposome est de");
Dialog.addMessage(lipodiam[width-5]);
Dialog.addMessage("pixels.");
Dialog.show();

// Remise en place pour positionnement selection micropipette :
close();
open(path);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
makeRectangle(xzone, yzone, widthzone, heightzone);
run("Mean...", "radius=16");
run("Select None");

// Sélection de la micropipette
title = "Micropipette";
msg = "Selection d'une portion pour mesurer le diamètre";
waitForUser(title, msg);
getSelectionBounds(x, y, width, height);

// balayage le long du rectangle établi
microdiam = newArray(width);
ydessin2 = height;
for (xi = x ; xi < x + width ; xi++) {
    makeLine(xi, y, xi, y+height );
    Profile = getProfile();
    // sur cette courbe on doit trouver 2 points d'inflexion :
    // le premier doit être dans la première moitié
    // on va définir une dérivée 'moyenne' sur 8 points :
    infl1=0;
    xinfl1=0;
    for (i=5; i<height/2; i++) {
        infli = ((Profile[i+4] + Profile[i+3] + Profile[i+2] +
Profile[i+1]) - (Profile[i-4] + Profile[i-3] + Profile[i-2] +
Profile[i-1]))/20;
        if (infl1>infl1) {
            infl1 = infli;          // on cherche le max de la
"dérivée"
            xinfl1 = i;          // pour garder sa position
        }
    }
    if (xinfl1<ydessin2) {
        ydessin2 = xinfl1;          // lieu pour le dessin de
la taille représentative
        xdessin2 = xi;
    }
    // le second doit être dans la dernière moitié
    infl2=0;
    xinfl2=0;
    for (i=height-4; i>height/2; i--) {
        infli = ((Profile[i+4] + Profile[i+3] + Profile[i+2] +
Profile[i+1]) - (Profile[i-4] + Profile[i-3] + Profile[i-2] +
Profile[i-1]))/20;
        if (infl1<infl2) {

```

```

                                infl2 = infli;    // on cherche le max de la
"dérivée"
                                xinfl2 = i;      // pour garder sa position
                                }
                                }
                                microdiam[xi-x] = xinfl2-xinfl1;
}
run("Select None");
// on va conserver les 9 valeurs les plus élevées et en prendre la
médiane (pour écarter les valeurs extrêmes)
microdiam = Array.sort(microdiam);
// On choisit la médiane des 9 dernières valeurs :
print("Le diamètre de cette micropipette est de",microdiam[width-
5],"pixels.");

// Affichage pour la micropipette :
close();
open(path);
makeRectangle(xdessin2,y+ydessin2,4,microdiam[width-5]);
run("Clear", "slice");
Dialog.create("Micropipette");
Dialog.addMessage("Le diamètre de la micropipette est de");
Dialog.addMessage(microdiam[width-5]);
Dialog.addMessage("pixels.");
Dialog.show();

// fin macro
}

```

Annexe G

Article

Fluctuations of a membrane nanotube revealed by high-resolution force measurements

F. Valentino^{a,b,c}, P. Sens^{a,b}, J. Lemièrre^{a,b,c,1}, A. Allard^{a,b,e}, T. Betz^d, C. Campillo^{e,*}, and C. Sykes^{a,b,*}

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/softmatter

Abstract: Pulling membrane nanotubes from liposomes presents a powerful method to gain access to membrane mechanics. Here we extend classical optical tweezers studies to infer membrane nanotube dynamics with high spatial and temporal resolution. We first validate our force measurement setup by accurately measuring the bending modulus of EPC membrane in tube pulling experiments. Then we record the position signal of a trapped bead when it is connected, or not, to a tube. We derive the fluctuation spectrum of these signals and find that the presence of a membrane nanotube induces higher fluctuations, especially at low frequencies (10-1000 Hz). We analyse these spectra by taking into account the peristaltic modes of nanotube fluctuations. This analysis provides a new experimental framework for a quantitative study of the fluctuations of nanotubular membrane structures that are present in living cells, and now classically used for *in vitro* biomimetic approaches.

1 Introduction

Liposomes, also called Giant Unilamellar Vesicles (GUVs), are spherical cell-sized objects made of a single lipid bilayer. They constitute a powerful tool in cell biophysics as bioreactors to mimic living cells¹ which allow for a bottom-up reconstitution of cell architecture and in particular the study of membrane-cytoskeleton mechanics in controlled conditions². The mechanics of such objects can be characterized by pulling membrane nanotubes from liposomes, as in the pioneering experiments of Evans³. Understanding the dynamics of such tubes is important from a practical point of view, because there are increasingly being used to probe cell mechanics, but also because they mimic the geometry of

filopodia and traffic intermediates.

Membrane nanotubes are formed when a high enough point force is applied perpendicularly to a liposome membrane. It has already been shown that the force necessary to pull a membrane tube depends on membrane mechanics (tension, bending elasticity modulus⁴, viscosity⁵). Most tube pulling experiments rely on micropipette aspiration of the liposome to fix membrane tension, while the tube is pulled by a microbead trapped in an optical tweezer system⁵⁻⁷. The force F on the tube can be related to the stiffness of the optical trap k_{trap} and the bead displacement from the trap centre d : $F = k_{trap} d$. Here, we use a back focal plane aligned Quadrant PhotoDiode (QPD)^{8,9} to detect relative bead displacements and Acousto-Optical Deflectors (AODs) to rapidly move the laser focus. The QPD allows for the recording of the bead motion relative to the laser focus with a high temporal resolution¹⁰⁻¹³ of up to 4 microseconds, well under the resolution of video-tracking (typically a few tens of milliseconds¹⁴). Hence, the force is measured with a sub pico-newton resolution.

First, we measure the force needed to hold nanotubes pulled out from liposome membranes and validate our force detection by the accurate measurement of membrane bending modulus. We show that our method allows for direct comparison of trapped bead fluctuations either attached to a membrane nanotube, or standing in solution. We can therefore, for the first time, infer the sole effect

^a Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 168, 75005 Paris, France.

^b Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.

^c Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 5 rue Thomas-Mann, 75205 Paris, France.

^d Institute of Cell Biology, Center for Molecular Biology of Inflammation, Cells-in-Motion Cluster of Excellence, Münster University, Von-Esmarch-Strasse 56, D-48149 Münster, Germany.

^e Université Evry Val d'Essonne, LAMBE, Boulevard F Mitterrand, Evry 91025, France.

¹ Present address: Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Nanobiology Institute, Yale University, New Haven, CT, USA.

* Corresponding authors: clement.campillo@univ-evry.fr; cecile.sykes@curie.fr

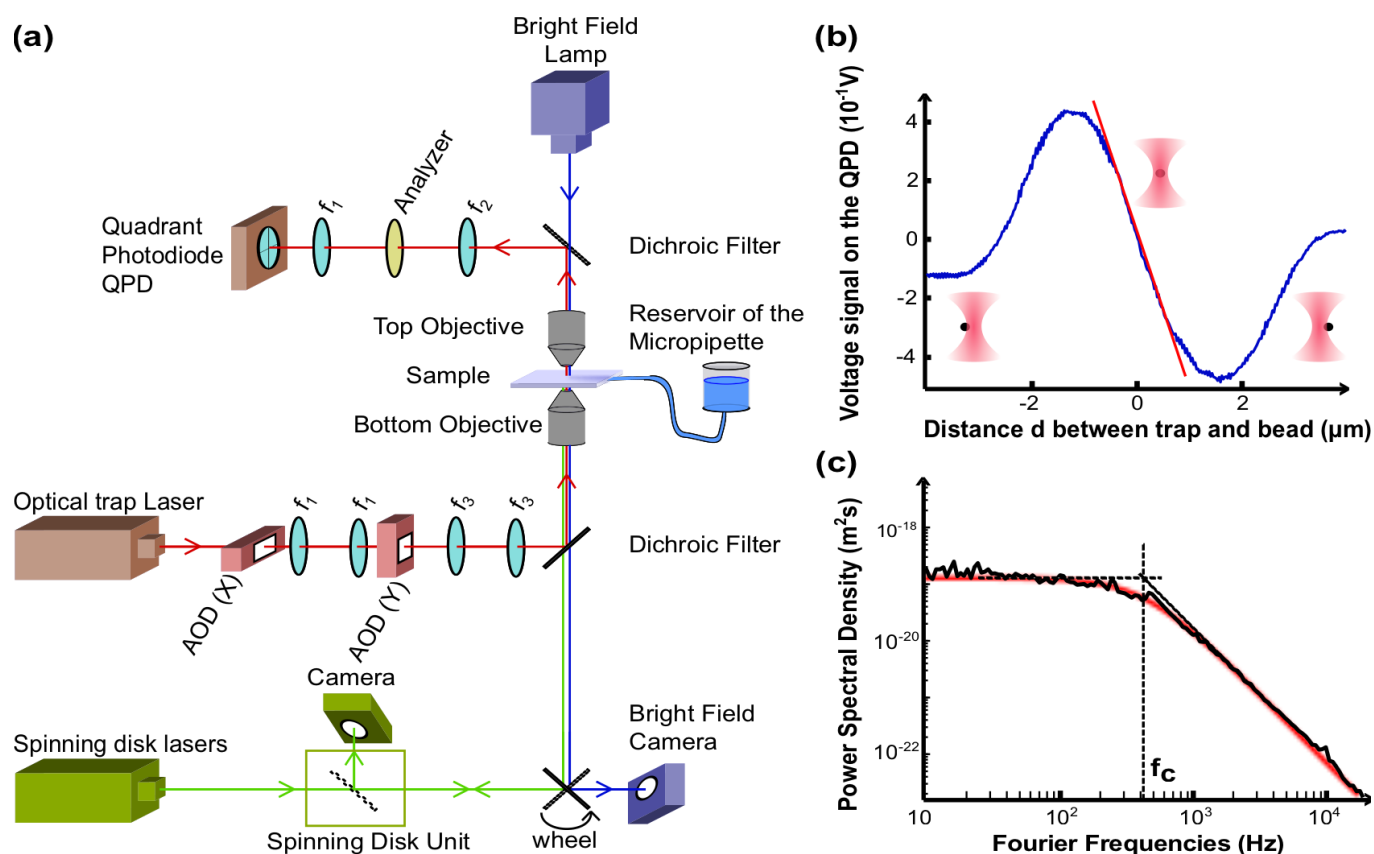


Fig. 1 (a) **Scheme of the tube pulling set-up.** The optical trap laser (red line) controlled by Acousto-Optic-Deflectors (AOD), interacts with the sample and is analyzed with a Quadrant PhotoDiode (QPD). Fluorescent signals are recorded using a spinning disk microscopy unit. The spinning disk lasers and the bright Field optical pathways are respectively represented in green and blue. (b) **QPD calibration.** The voltage signal on the QPD is recorded as the trap is moved rapidly to scan a bead (see Materials and method 2.7). The linear regime fitted by the red line provides the QPD calibration. Here the slope value is $(-0.42 \pm 0.01) V \cdot \mu m^{-1}$. (c) **Trap stiffness calibration.** A Lorentzian curve (red) is fitted to the Power Spectral Density (black) of the position of a bead that evolves freely in the optical trap. In this case, k_{trap} is $41 pN \cdot \mu m^{-1}$.

of fluctuations of membrane nanotubes. We find that at low frequencies (10–1000 Hz), the fluctuation of the bead position is increased when a tube is attached, an effect that can be explained by radius fluctuations of the tube. Our work paves the way to a new characterisation of membrane nanotubes that may reveal new features previously hidden, due to experimental time resolution limitations.

2 Materials and methods

2.1 Lipids, reagents and buffers

EPC (L- α -phosphatidylcholine from egg yolk) and biotinylated lipids (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol) 2000]), are purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Beads are polystyrene, streptavidin-coated beads 0.5% w/v 3.05 μm diameter from SpheroTech, (Illinois, USA). The commercial solution is diluted 500 times.

Different inside and outside buffers are used. The internal buffer consists in 20 mM HEPES (pH 7), 100 mM sucrose and 10 $\mu g \cdot L^{-1}$ Sulforhodamine B. The external buffer contains 10 mM HEPES (pH 7), 50 μM $CaCl_2$, 1 μM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO), 2 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 50 mM KCl, and 70 mM glucose.

Both buffers are set at 7 pH. Osmolarity (Vapro 5600, WESCOR, USA) of the internal buffer is 170 $mOsm \cdot L^{-1}$ and external buffer is 200 $mOsm \cdot L^{-1}$ to have an external buffer slightly more concentrated and allow for liposome deflation ($\Delta Osm = + 30 mOsm \cdot L^{-1}$).

2.2 Liposome formation

Liposomes are formed using the standard electroformation method¹⁵. The lipid mix (molar ratio 99% EPC / 1% biotinylated lipids) is dissolved at 2.5 $g \cdot L^{-1}$ in chloroform/methanol at a volume ratio of 5/3. A volume of 4 μL of this solution is spread on an ITO-coated (Indium Tin Oxide) glass slide (63691610PAK, Sigma Aldrich, Germany). The slides are stored in a vacuum chamber for 2 hours to evaporate the solvent. Then two slides are assembled into a chamber, their conductive sides facing each other, filled with the internal buffer and sealed with Vitrex® (Vitrex Medical A/S, Denmark). An alternative electric field (10 Hz, 2.3 V peak to peak) is applied across the chamber over night. Liposomes can be stored at 4°C for up to a week.

2.3 Micropipette preparation

Micropipettes are obtained from borosilicate capillaries (0.7/1.0 mm inner/outer diameter, Kimble, USA), using a puller (P2000, Sutter Instrument, USA) with parameters: Heat 360, Pull 100,

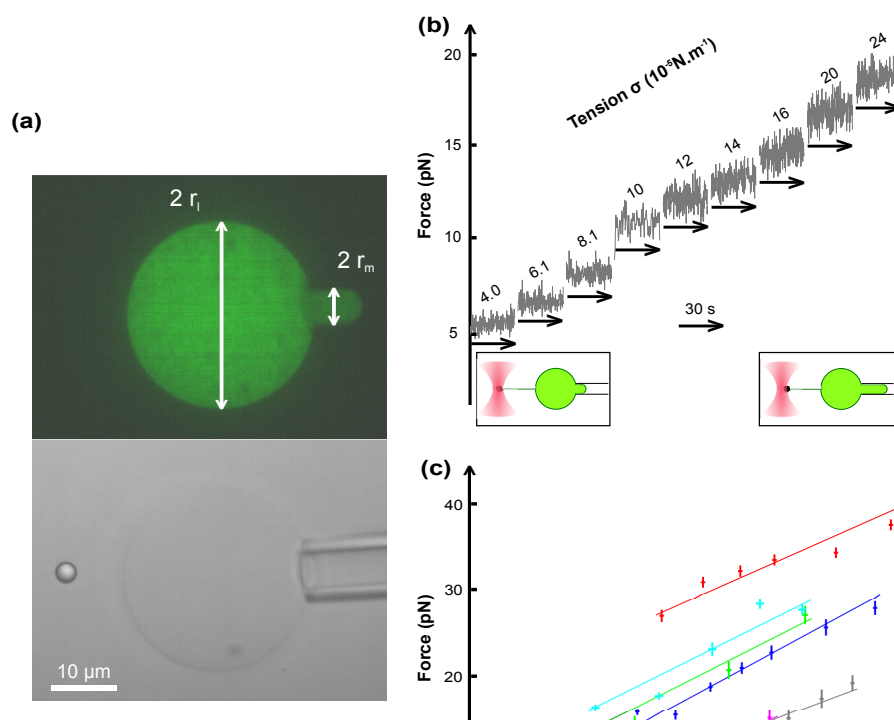


Fig. 2 (a) View of the experiment. A liposome observed by confocal (top) and bright field illumination (bottom) filled with sulforhodamine B (green) and held in a micropipette. **(b) Force measurements.** Evolution of the force on a bead in a tube pulling experiment at different fixed tension, with a fixed tube length of 8 μm . The force for each tension is recorded during 30 s. Experiments are done with $k_{\text{trap}} = (37 \pm 6)$ pN. μm^{-1} . **(c) Bending modulus measurements.** Forces as a function of $\sigma^{1/2}$ for 6 different liposomes. The fitted lines give access to the bending modulus (κ) of the liposome through the slope $2\pi\sqrt{2\kappa}$ (see Eq.4).

Velocity 30, Fil 4, Del 180. Micropipette tips are then micro-forged (MF 830, Narishig, Japan) up to 5-6 μm internal diameter. Just before experiments, they are filled with a passivation buffer containing 0.5 g.L⁻¹ β -casein (C6905, Sigma Aldrich, Germany) diluted in water and adjusted at pH 7 using caustic soda.

2.4 Chamber preparation

The experimental chamber is made of two glass coverslips (0.13-0.16 mm, Menzel Gläse, Australia) separated by a 1 mm layer of steel. The total volume of such a chamber is 200 μL . Walls of the chamber and the outside of the aspiration micropipette are passivated with 5 g.L⁻¹ β -casein diluted in water by incubation for 15 minutes. This solution is then aspirated by a tissue paper (Kimtech®, Kimberly-Clark, USA) and replaced by the external buffer. Beads (1 μL) and liposomes (10 μL from the electroformation solution) are added. The micropipette is positioned in the focus plane of the objective inside the chamber. The pressure inside the micropipette is then fixed to zero by adjusting the height h of the reservoir (Fig. 1a) to stop any liquid flow in the micropipette. After aspirating a liposome, its tension σ can be modified according to the Laplace law by changing the aspiration of the micropipette (Eq. 1), which can be done by modifying the height h of the reservoir (counted as positive if the reservoir is lowered):

$$\sigma = \frac{1}{2} \rho g |h| r_m \left(1 - \frac{r_m}{r_l}\right)^{-1} \quad (1)$$

ρ is the density of the aspirating fluid (here water), r_m the radius of the micropipette, and r_l the radius of the liposome. Finally, the chamber is sealed by mineral oil (8042-47-5, Sigma Aldrich, Germany) to prevent evaporation.

2.5 Optical tweezers

A major advantage of our method is that we rapidly calibrate the trap stiffness and measure forces *in situ* during each experiment. The calibration is done directly on the bead used for tube pulling and we hence avoid systematic errors due to bead polydispersity. The setup, as shown in Fig. 1(a), consists in an Infra Red (IR) laser ($\lambda = 1064$ nm, $P = 5$ W, YLM-5-LP-SC, IPG Laser, Germany) which is intensity - and direction - controlled by an XY AOD pair (MT80- A1, 51064 nm, AA Opto Electronic, France). Two lenses ($f_1 = 50$ mm) are put between the AODs for a correct conjugation. The beam is then injected into the microscope (Eclipse Ti, Nikon, Japan) by a dielectric mirror (Beamsplitter, AHF, Germany). The light is focused by the bottom water immersion objective (PLAN APO VC 60x/1.2WI OFN 25 DIC N2, Nikon, Japan) on the sample, mounted on a 2D piezo stage for precise sample positioning (MS 2000, ASI, USA). After interaction with the sample, the light is collected by the top water immersion objective (NIR APO 60x/0.80W DIC N2, Nikon, Japan) that acts as a condenser. A mirror reflects the beam, and two lenses ($f_2 = 150$ mm, $f_3 = 100$ mm) image the back focal plane of the top objective on a QPD (PDQ-30-C, Thorlabs, Germany). To adjust the intensity of the laser on the QPD without changing the stability of the laser, an analyzer is added.

The optical tweezer is controlled by a custom written control program (Labview 2011, National Instruments, USA). A frequency generator and a high frequency amplifier respectively control the AODs by the analogic channels of two data acquisition cards (NI-DAQ 6363, National Instruments, USA), to adjust the position and the trap stiffness. The analog input of the same cards reads the voltage signals from the QPD. The synchronization of both signal

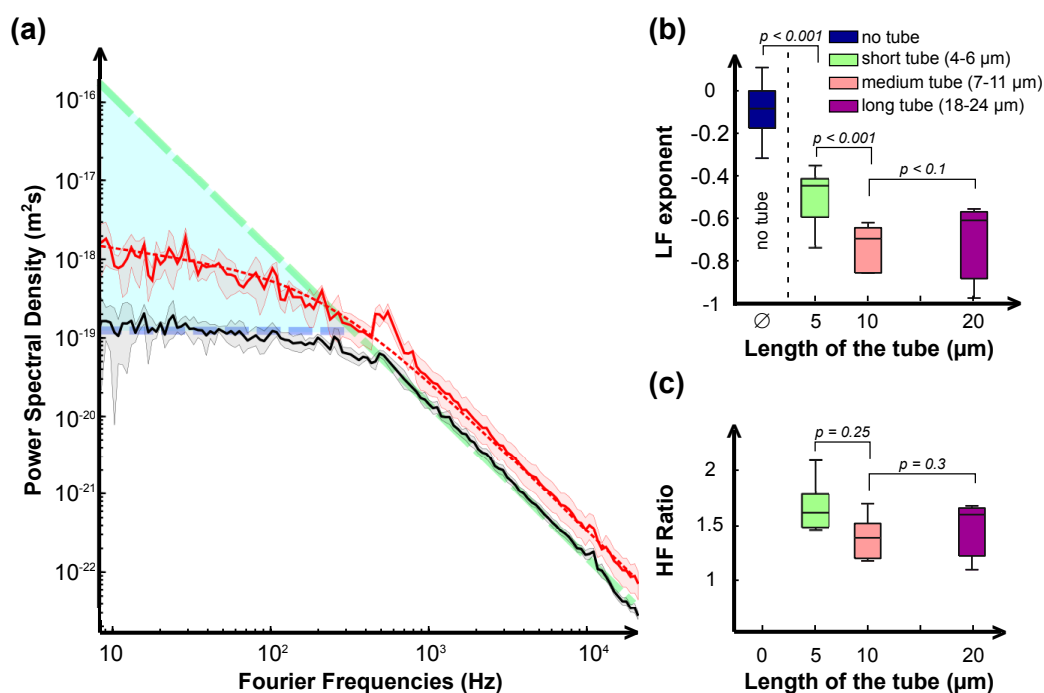


Fig. 3 (a) PSDs comparison. Example of a PSD of a free bead (black) as the liposome / micropipette system is far from the bead ($> 15 \mu\text{m}$) and the same bead attached to a tube (red). Dashed red line is obtained by fitting the curve according to Eq. 10. The tube is $9.0 \mu\text{m}$ long, $k_{\text{trap}} = 38 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, and slopes measured at $0.27 \pm 0.01 \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ with a tube, and $0.26 \pm 0.01 \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ without. **(b) LF exponent at different lengths.** Exponent of the PSD measured between 10 and 200 Hz as a function of the length of the pulled tube. P-values are obtained by t-test ($N = 9$ independent experiments). **(c) HF Ratio at different lengths.** Ratio $\text{PSD}_{\text{tube}}/\text{PSD}_{\text{freebead}}$ measured between 1 kHz and 10 kHz ($n = 9$). This ratio is 1 (not shown) for a free bead.

generation and acquisition is performed at 250 kHz: $2 \mu\text{s}$ is the shortest time resolution for our set-up.

2.6 Image acquisition

Images obtained by bright field illumination are recorded by a CMOS Camera (DCC 1545 M-GL, Thorlabs, Germany). Images obtained by confocal laser illumination (CSUX1 Yokogawa, Andor Technology, Ireland) are recorded by a high resolution sCMOS Camera (Andor Neo, Ireland). A motorized prism ensures the switch from one to the other.

2.7 QPD calibration

Classically, the position d of the bead is measured by video tracking and is thus limited in spatial and temporal resolution¹⁶. Here, the back focal plane technique, based on interference of the light scattered and unscattered by the bead⁹, allows us to obtain a voltage signal on the QPD, V_{QPD} on Fig. 1(b), proportional to the relative position d of the bead to the centre of the trap. We calibrate the voltage to μm ratio of V_{QPD} by controlled and fast ($4 \mu\text{s}$) variation of the laser focus position d using the AODs while recording V_{QPD} . During this short time, the bead is submitted to a maximal force of 80 pN that corresponds to a maximal displacement of 8 nm , so the bead is well immobile as $V_{\text{QPD}}(d)$ is recorded. To ensure that the bead position can equilibrate at the trap centre, we maintain the trap immobile for $100 \mu\text{s}$ at the central position before visiting a new position. This procedure¹⁷ is repeated for $-3 \mu\text{m} < d < 3 \mu\text{m}$ with a stepsize of 20 nm to get a complete scan as shown in Fig. 1(b). The linear regime is fitted to obtain the conversion $V_{\text{QPD}}(d)$. Whole QPD calibration takes 1.2 second and is performed before each measurement, *in situ*.

2.8 Trap stiffness k_{trap} calibration

The trap stiffness k_{trap} is often assessed by applying a series of known frictional forces on the bead and measuring its displacement. In our approach, when the bead is optically trapped, it is submitted to the trap force, the viscous Stokes force, and the fluctuation (Brownian) force that varies in time $\Gamma(t)$. Thus, the distance between the centre of the bead and the centre of the trap follows a Langevin equation Eq. (2), where η is the dynamic viscosity of water, r_{bead} the radius of the bead, and $\dot{d}$ the time derivative of d .

$$k_{\text{trap}} d(t) + 6\pi\eta r_{\text{bead}} \dot{d}(t) = \Gamma(t) \quad (2)$$

Using the Fourier transform, we can get¹⁷ the Power Spectral Density (PSD) of the position of the bead (relative to the centre of the optical trap) as shown in Eq. (3), where T_{exp} is the duration of the experiment. Trap linearity is checked by applying a Stokes force to the bead displaced at an imposed velocity (Fig. S1). Note that measuring k_{trap} through bead fluctuations and imposed Stokes forces gives identical results.

$$\text{PSD}(f) = \frac{|\tilde{d}^2(f)|}{T_{\text{exp}}} = \frac{1}{T_{\text{exp}}} \frac{|\tilde{\Gamma}^2|}{1 + f^2/f_c^2}, f_c = \frac{k_{\text{trap}}}{12\pi^2\eta r_{\text{bead}}} \quad (3)$$

With $|\tilde{\Gamma}^2| = 12\pi\eta r_{\text{bead}} k_B T T_{\text{exp}}$. To obtain the corner frequency f_c the PSD of the trapped bead position is fitted by a Lorentzian as seen in Fig. 1(c) to extract k_{trap} . We measure the trap stiffness before each experiment, on average it is $(37 \pm 6) \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for a laser

power of 80 mW on the sample. All fits are obtained by Matlab R2012b (8.0.0.783).

3 Results

3.1 Tube pulling experiments

First, we want to validate our experimental force detection by pulling membrane nanotubes from liposomes. We thus measure the bending modulus of their membrane, and then compare the obtained values to published ones. The experiment procedure is as follows: we aspirate a liposome with a micropipette, at a fixed tension set by h Eq. (1). A membrane tongue is created in the micropipette Fig. 2(a). Then, we catch a free bead with the optical tweezer and calibrate the signal of the QPD ($V_{QPD}(d)$ and k_{trap} , see Materials and methods and Fig. 1(b and c)). The liposome is slowly approached to touch the bead, and then pulled away to form a nanotube of more than 1 μm , over the threshold of nucleation of a cylindrical tube at a fixed membrane tension, as already described both experimentally¹⁸ and theoretically¹⁹. Then, $V_{QPD}(d)$ is calibrated again in the presence of the tube for an accurate measurement of the bead distance to the trap centre, d .

The evolution of the force exerted on the bead is recorded as a function of time. Fluctuations of the force are observed on a 30 second time frame (Fig. 2(b)). Membrane tension is increased stepwise by lowering the altitude h of the reservoir, which increases the aspiration pressure. A pause of 30 s is made between each step to let the system relax to its equilibrium. Theoretically, the equilibrium force to maintain a nanotube is given by Eq. (4)²⁰.

$$F = 2\pi\sqrt{2\kappa_b\sigma} \quad (4)$$

Where σ is the membrane tension of the liposome, and κ_b the bending modulus of the membrane. We observe that the average force increases with tension, in qualitative agreement with Eq. (4). Moreover, we find that the force is proportional to $\sigma^{1/2}$ Fig. 2(c), and using Eq. (4) gives an estimate of the bending modulus of $(8.6 \pm 2.4) k_B T$. This value is in accordance with published values for EPC membranes^{21,22}, demonstrating the validity of our experimental system for equilibrium force measurements.

3.2 Nanotube fluctuations

To take advantage of the high temporal and spatial resolution of our tube pulling setup, we now address how bead fluctuations are modified by the presence of a membrane nanotube attached to its surface. Fig. 2(b) already shows that increasing tension leads to an increase in force fluctuation amplitude. This observation prompted us to characterize these fluctuations in more detail.

The fluctuations of the same bead, in the absence (free bead) or in the presence of a membrane tube, are recorded after a new $V_{QPD}(d)$ calibration (see Material and methods). The linear dependence of the QPD voltage $V_{QPD}(d)$ as a function of bead position in the trap is systematically checked (see Material and methods) in the presence and in the absence of the membrane nanotube (Fig. S2). As can be observed in Fig. S2, the slopes of this linear regime slightly differ, and we take into account each relevant value for an accurate determination of bead position. Bead fluctuations can then be recorded in the absence or in the presence of a membrane nanotube and we show that the amplitude of bead fluctuations

increases when a nanotube is present (Fig. S3-4). This is confirmed by standard deviation estimates in the presence of a tube (Fig. S5). Moreover, these amplitudes slightly increase when the tube is longer (Fig. S3) or when membrane tension is higher Fig. S4).

Bead fluctuations are then processed into a PSD curve as a function of frequency (Fig. 3(a), free bead, black; same bead attached to a nanotube (red)). As expected, the free bead curve can be fitted by a Lorentzian (Fig. 1(c), Eq. 3) and shows a plateau at low frequency (blue dashed line Fig. 3(a)) and a (-2) exponent at high frequency (green dashed line Fig. 3(a)), in agreement with Eq. (3). Strikingly, the PSD obtained in the presence of a membrane tube is very different. At low frequencies, the PSD radically differs from the plateau behaviour; to characterize this behaviour at low frequencies we fit the PSD curve between 10 and 200 Hz by a simple power law and obtain a low frequency exponent called "LF exponent". At high frequencies, we obtain parallel curves, indicating that the (-2) exponent is unchanged whereas there is a shift of the PSD curve in the presence of a membrane tube. In order to quantify this shift, we measure the ratio of the PSD in the presence versus in the absence of the membrane tube $\text{PSD}_{\text{tube}} / \text{PSD}_{\text{freebead}}$ at high frequencies (between 1 and 10 kHz) and we call this high frequency ratio "HF ratio".

Both LF exponent and HF ratio characterize the fluctuations of the bead either in the absence or in the presence of a membrane tube. Whereas the LF exponent is found to be close to zero for a free bead (Fig. 1(c), S6), we find that it decreases to (-0.5) for a tube with an average length of 4 μm (Fig. 3(b), S6). Varying the length of the tube while keeping membrane tension constant does not alter the average value of the force (Eq. (4)). It only slightly alters the HF ratio (Fig. 3(c)) and the LF exponent (-0.7) .

Keeping tube length constant and varying membrane tension also leads to a modification of the PSD curve (Fig. S7). We find indeed that the HF ratio drastically increases with tension (Fig. S8) whereas the LF exponent does not significantly change (Fig. S9).

Discussion

Our setup allows for a correct determination of bending elasticity modulus, thus validating the tube pulling procedure. Furthermore, we take advantage of the possibility to calibrate the bead position *in situ* before each experiment, to record an accurate value of bead position as a function of time. Our setup therefore leads to unprecedented precision on tube fluctuations. The precision of our setup relies on two facts: 1) that we use a QPD and back focal plane technique developed for optical tweezers systems⁹ and 2) that we are able to calibrate the exact bead that is used for a tube pulling experiment and compare the same bead in a free state and once attached to a membrane tube.

The PSD of a free bead has two regimes depending on the frequency. At high frequency (1-10 kHz), Eq. (3) leads to Eq. (5), where the exponent (-2) represents the purely viscous regime.

$$\text{PSD}_{\text{HF}}(f) = \frac{1}{T_{\text{exp}}} \frac{|\tilde{T}^2|/k_{\text{trap}}^2}{f^2/f_c^2} \quad (5)$$

At low frequency, Eq. (3) leads to Eq. (6); the plateau (LF exponent is equal to zero) corresponds to the elastic regime of the bead in a trap.

$$PSD_{LF}(f) = \frac{1}{T_{exp}} |\tilde{\Gamma}^2| / k_{trap}^2 \quad (6)$$

The presence of a membrane tube has two major effects, one at low, one at high frequency. Note that the presence of a membrane (without a tube) also changes the bead PSD, as was experimentally observed in²³. We find that at low frequency, the LF exponent drastically differs from zero in the presence of a tube (Fig. 3(a)). This effect shows that the pure elastic regime is no longer valid. We define a viscous-elastic triangle delimited by the viscous regime (green dashed line Fig. 3(a) with exponent (-2)) and the elastic regime (blue dashed line with exponent (0)). The PSD in the presence of a tube appears in this triangle, thus indicating a viscous component. At high frequency, the PSD in the presence of a tube is systematically positioned above the free bead PSD. This shift still needs to be understood.

In order to derive the PSD of a bead attached to a fluctuating tube, we make use of the Fluctuation-Dissipation Theorem (FDT), which relates the PSD $S_l(f)$, to the mechanical response function $\chi(f)$, itself linking the variation of the tube extension $\delta x(f)$ to a small force $\delta F(f)$ applied to the end of the tube ($\delta l_f = \chi_{tube}(f) \delta F_f$). The FDT reads²⁴:

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\pi f} \text{Im}[\chi(f)] \quad (7)$$

The dynamics of membrane tube fluctuations are quite complicated, and involve a combination of peristaltic (squeezing) modes, where the tube remains axisymmetrical but its radius changes, and bending modes, where the tube radius remains constant, but its axis undulates²⁵. Another complication is that the variation of the tube shapes involves both membrane and solvent transfer between the tube and the liposome from which it is pulled. Here, we use an approximate expression of the tube mechanical response function that focuses on the peristaltic modes and assumes membrane area is not transferred between the tube and the liposome, as should be appropriate for the high frequency response. In this limit, the response function is related to the oscillation frequency according to²⁶:

$$\chi_{tube}(f) = \frac{\tanh q_f L}{q_f F}, q_f = \sqrt{\frac{2\pi f}{i D_r}}, D_r = \frac{F}{32\pi\eta_l} \quad (8)$$

Here, F is the average tether force (Eq.(4)), L the average tube length, and η_l the viscosity of the solvent inside the tube. The dynamics of tube relaxation is thus controlled by a “diffusion coefficient” D_r , which taking $F_0 = 20$ pN and $\eta_l = 10^{-3}$ Pa.s, is of order $D_r = 200 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. This response function depends on the tube length L . However, this dependency disappears in the limit $|q_f L| \gg 1$, that is in the limit of high frequency, where a perturbation at the open end of the tube decays exponentially over a length $\sim 1/|q_f|$ much smaller than the tube length. The crossover frequency is given by $f_L = D_r/2\pi L^2$, which is of order 0.3 Hz for $L = 10 \mu\text{m}$, so the tube length should not affect the mechanical response function for the frequency range reported here.

The full response function χ is obtained considering the tether acts on the bead in parallel with the visco-elastic environment (solvent plus optical trap), so that:

$$\chi = \frac{1}{1/\chi_{trap} + 1/\chi_{tube}} = \frac{1}{12\pi^2\eta r_{bead}} \frac{1}{f_c + if + (1+i)\sqrt{f_t f}} \quad (9)$$

$$\text{with } f_t = \frac{F^2}{4\pi D_r (6\pi\eta r_{bead})^2} = \frac{2}{9} \frac{F\eta_l}{(\pi\eta r_{bead})^2}$$

Finally, the PSD is:

$$S_l(f) = \frac{k_B T}{12\pi^3\eta r_{bead}} \frac{1 + \sqrt{f_t/f}}{(f_c + \sqrt{f_t f})^2 + (f + \sqrt{f_t f})^2} \quad (10)$$

This PSD is thus characterised by two parameters: the trap cutoff frequency f_c , and the “tube” frequency f_t . Using values of the trap stiffness $k_{trap} = 40 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, $F = 20$ pN and $r_{bead} = 1.5 \mu\text{m}$, values corresponding to Fig 3.a, we calculate $f_c = 225$ Hz and $f_t = 200$ Hz. This shows that the typical tube frequency is expected to be of the same order than the cut-off frequency. One thus expects the tube dynamics to strongly influence the fluctuation spectrum of the bead in the frequency range of interest. At low frequency, Eq 10 leads to $S_l(f) \sim \sqrt{f_t}/(f_c^2 \sqrt{f})$ thus a low-frequency exponent of -0.5, close to the value we obtained for short tubes and in qualitative agreement with our observation for all tether lengths (Fig. 3(b)).

The model that includes only peristaltic modes of tether deformation allows for qualitative explanation of our observations, namely an increase of the amplitude of low-frequency oscillations and a high-frequency response dominated by the viscous drag on the bead. Further refinement would be needed to fully explain our experimental data, as the fitted values correspond to $f_t = f_c/5$ (30 and 150 Hz for Fig. 3(a), the same trend is observed in N=9 experiments) while our estimate suggest $f_t \sim f_c$.

Conclusions

We have built a system that allows formation of membrane nanotubes using an *in situ* calibration of force measurements. We have validated this approach by accurate measurements of liposome membrane bending moduli. Moreover, this set-up allows us to record the force fluctuations of membrane nanotubes at an unprecedented high frequency. We show that the fluctuations spectrum of a bead attached to a membrane nanotube exhibits a modification at low frequency that we explain by tube radius fluctuations. The understanding of tube dynamics is important from a practical point of view, because membrane tubes are increasingly being used to probe cell mechanics, but also because they mimic the geometry of filopodia and traffic intermediates. This work paves the way for further studies in particular of nanotubes submitted to active fluctuations that are present in cells.

Acknowledgements

This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR), grant ANR 09BLAN0283 and ANR 12BSV5001401, and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), grant DEQ20120323737.

26 P. Nassoy, D. Cuvelier, R. Bruinsma and F. Brochard-Wyart, *EPL Europhys. Lett.*, 2008, **84**, 18004.

References

- 1 K. Carvalho, F.-C. Tsai, E. Lees, R. Voituriez, G. H. Koenderink and C. Sykes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 16456–16461.
- 2 K. Guevorkian, J. Manzi, L.-L. Pontani, F. Brochard-Wyart and C. Sykes, *Biophys. J.*, 2015, **109**, 2471–2479.
- 3 E. Evans and A. Yeung, *Chem. Phys. Lipids*, 1994, **73**, 39–56.
- 4 A. Roux, *Soft Matter*, 2013, **9**, 6726.
- 5 O. Rossier, D. Cuvelier, N. Borghi, P. H. Puech, I. Derényi, A. Buguin, P. Nassoy and F. Brochard-Wyart, *Langmuir*, 2003, **19**, 575–584.
- 6 B. Sorre, A. Callan-Jones, J. Manzi, B. Goud, J. Prost, P. Bassereau and A. Roux, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, **109**, 173–178.
- 7 C. Campillo, P. Sens, D. Köster, L.-L. Pontani, D. Lévy, P. Bassereau, P. Nassoy and C. Sykes, *Biophys. J.*, 2013, **104**, 1248–1256.
- 8 P. Ramesh, Y. F. Baroji, S. N. S. Reihani, D. Stamou, L. B. Oddershede and P. M. Bendix, *Sci. Rep.*, 2013, **3**.
- 9 F. Gittes and C. F. Schmidt, *Opt. Lett.*, 1998, **23**, 7.
- 10 K. C. Vermeulen, J. van Mameren, G. J. M. Stienen, E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite and C. F. Schmidt, *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, **77**, 13704.
- 11 F. Gittes, B. Schnurr, P. D. Olmsted, F. C. MacKintosh and C. F. Schmidt, *Phys. Rev. Lett.*, 1997, **79**, 3286–3289.
- 12 T. Bornschlogl, S. Romero, C. L. Vestergaard, J.-F. Joanny, G. T. Van Nhieu and P. Bassereau, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 18928–18933.
- 13 S. F. Tolić-Nofrelykke, E. Schäffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher and H. Flyvbjerg, *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, **77**, 103101.
- 14 C. Prévost, H. Zhao, J. Manzi, E. Lemichez, P. Lappalainen, A. Callan-Jones and P. Bassereau, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 8529.
- 15 M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1986, **81**, 303.
- 16 M. Bretou, O. Jouannot, I. Fanget, P. Pierobon, N. Larochette, P. Gestraud, M. Guillon, V. Emiliani, S. Gasman, C. Desnos, A.-M. Lennon-Dumenil and F. Darchen, *Mol. Biol. Cell*, 2014, **25**, 3195–3209.
- 17 H. Turlier, D. A. Fedosov, B. Audoly, T. Auth, N. S. Gov, C. Sykes, J.-F. Joanny, G. Gompper and T. Betz, *Nat. Phys.*, 2016, **12**, 513–519.
- 18 A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau and B. Goud, *EMBO J.*, 2005, **24**, 1537–1545.
- 19 G. Koster, A. Cacciuto, I. Derényi, D. Frenkel and M. Dogterom, *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**.
- 20 R. E. Waugh and R. M. Hochmuth, *Biophys. J.*, 1987, **52**, 391–400.
- 21 S. A. Simon, S. Advani and T. J. McIntosh, *Biophys. J.*, 1995, **69**, 1473–1483.
- 22 P. Girard, J. Prost and P. Bassereau, *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**.
- 23 E. Helfer, S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F. C. MacKintosh and D. Chatenay, *Phys. Rev. E*, 2001, **63**, 21904.
- 24 R. Kubo, *Rep. Prog. Phys.*, 1966, **29**, 255.
- 25 K. L. Gurin, V. V. Lebedev and A. R. Muratov, *JETP*, 1996, **83**, 321–326.

Electronic Supplementary Information

Fluctuations of a membrane nanotube revealed by high-resolution force measurements

F. Valentino^{a,b,c}, P. Sens^{a,b}, J. Lemièrre^{a,b,c,1}, A. Allard^{a,b,e}, T. Betz^d, C. Campillo^{e,*}, and C. Sykes^{a,b,*}

^{a.} Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 168, 75005 Paris, France.
^{b.} Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.
^{c.} Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 5 rue Thomas-Mann, 75205 Paris, France.
^{d.} Institute of Cell Biology, Center for Molecular Biology of Inflammation, Cells-in-Motion Cluster of Excellence, Münster University, Von-Esmarch-Strasse 56, D-48149 Münster, Germany.
^{e.} Université Evry Val d'Essonne, LAMBE, Boulevard F Mitterrand, Evry 91025, France.
^{1.} Present address: Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Nanobiology Institute, Yale University, New Haven, CT, USA.

* Corresponding authors: clement.campillo@univ-evry.fr; cecile.sykes@curie.fr

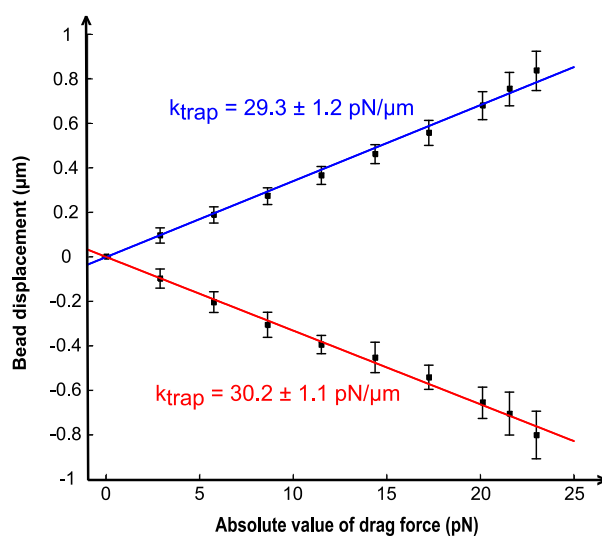


Figure S1: Trap linearity. Evolution of the bead displacement measured using the QPD as a function of the viscous force applied. Laser power is 80 mW, and the distance from the glass surface is 100 μm . The measurement is performed in two directions: negative speeds (red) and positive speeds (blue). The slopes of those fits is linked to the trap stiffness (indicated on the figure) via the relation $F_{\text{Stokes}} = k_{\text{trap}} d$. Those values are in correct agreement with the trap stiffness calculated through the PSD ($k_{\text{trap}} = 30.6 \pm 1.0 \text{ pN}/\mu\text{m}$). Error bars represent 2 SD.

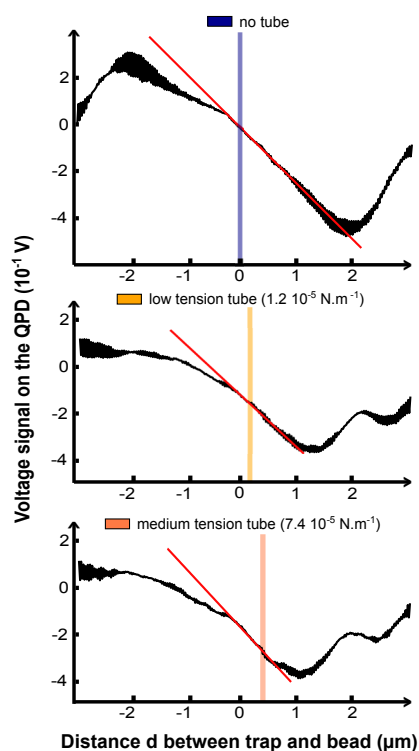


Figure S2: Positions of the bead during a tube pulling experiment in the linear regime. The bead positions change during the tube pulling experiment but the bead always remains in the linear part (red line) of the QPD calibration curve (black). "no tube" refers to a free bead (a trapped bead not attached to a tube). Slope values are $(-0.24 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead not attached to a tube, $(-0.21 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead attached with the low tension tube, and $(-0.23 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the medium tension tube. $k_{\text{trap}} = 37 \pm 2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

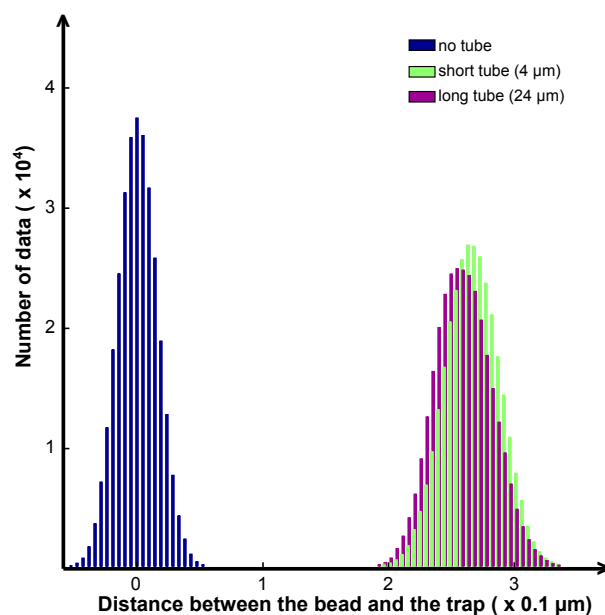


Figure S3: **Distributions of the position of the bead** recorded by the QPD in 5 seconds for different lengths of the same tube. Slopes are measured at $(-0.28 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead not attached to a tube, $(-0.29 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead attached with the short tube, and $(-0.26 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the long tube. $k_{\text{trap}} = 35 \pm 2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

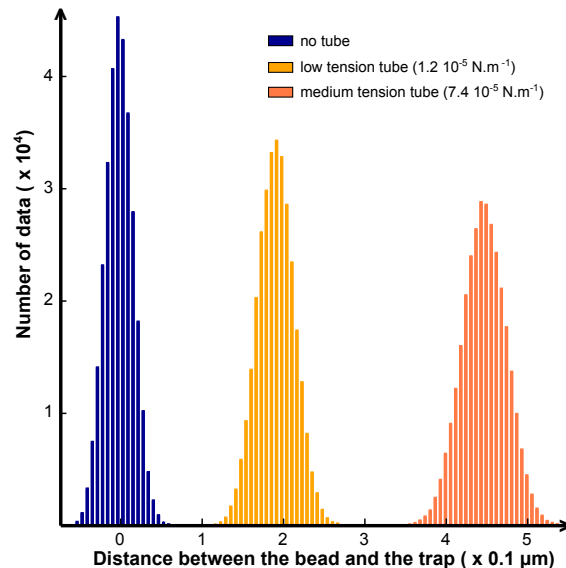


Figure S4: **Distributions of the position of the bead** recorded by the QPD in 5 seconds for different tensions of the same tube. Slopes are measured at $(-0.24 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead not attached to a tube, $(-0.21 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead attached with the low tension tube, and $(-0.23 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the medium tension tube. $k_{\text{trap}} = 37 \pm 2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

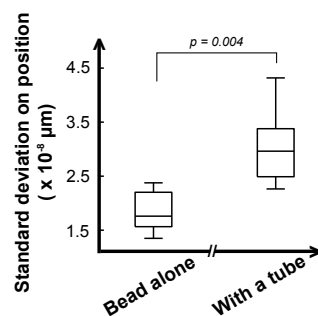


Figure S5: **Standard deviation** of the position of the bead before and after a tube is pulled (obtained on $N = 9$ independent experiments).

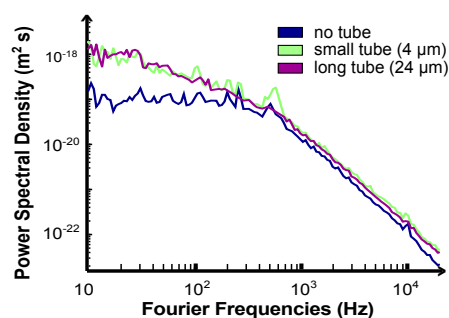


Figure S6: **Effect of tube length on the PSD.** PSD of a free bead (blue) compared to the PSDs of the same bead attached to tube at different length. Slopes are measured at $(-0.28 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead not attached to a tube, and $(-0.26 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the long tube. $k_{\text{trap}} = 35 \pm 2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

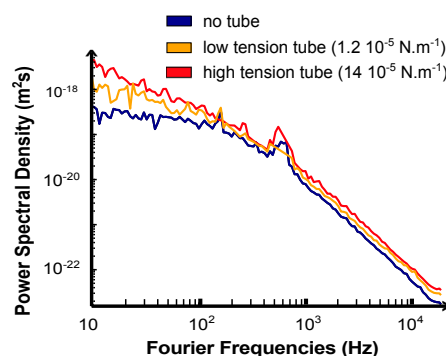


Figure S7: **Effect of tube tension on the PSD.** PSD of a free bead (blue) compared to the PSDs of the same bead attached to tube at different tension. Slopes are measured at $(-0.28 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead not attached to a tube, $(-0.26 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the bead attached with the low tension tube, and $(-0.30 \pm 0.01) \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ for the medium tension tube. $k_{\text{trap}} = 43 \pm 2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

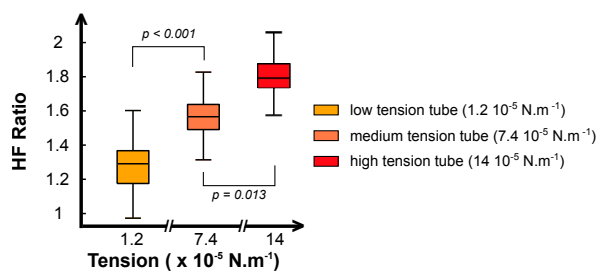


Figure S8: **Effect of the tension on the exponent at high frequency.** Estimation of the ratio PSD with tube / PSD without tube measured between 1 kHz and 10 kHz ($n = 2$).

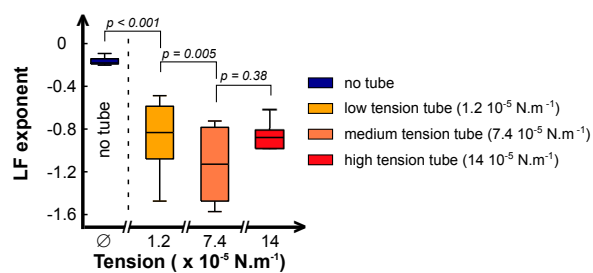


Figure S9 **Effect of the tension on the ratio $\text{PSD}_{\text{tube}} / \text{PSD}_{\text{freehead}}$ at low frequency.** Estimation of the slope of PSDs measured between 10 and 200 Hz (in log log plot) in function of the liposome tension of the pulled tube ($n = 2$).

Annexe H

Etude théorique des PSDs (Pierre Sens)

In order to derive the power spectrum density (PSD) of a bead attached to a fluctuating tube, we make use of the Fluctuation-Dissipation theorem (FDT), which related the PSD $S_l(\omega)$, to the mechanical response function $\chi(\omega)$ linking the variation of the tube extension $\delta x(\omega)$ to a small oscillating force $\delta f(\omega)$ applied to the end of the tube ($\delta l_\omega = \chi(\omega)\delta f_\omega$). The FDT reads [1]:

$$S_x(\omega) = \frac{2k_B T}{\omega} \text{Im}[\chi(\omega)] \quad (1)$$

◇ PSD in the absence of a tube. If the bead is not connected to the tube, its equation of motion is that of a damped oscillator:

$$\gamma \dot{\delta x} + k \delta x = \delta f \quad (2)$$

with $\gamma = 6\pi\eta R$ is the Stokes friction coefficient (η is the outside viscosity and R the bead radius). Using the temporal Fourier transform $\delta x = \delta x_\omega e^{-i\omega t}$ and $\delta f = \delta f_\omega e^{-i\omega t}$, the response function $\chi_{trap}(\omega) = \delta x_\omega / \delta f_\omega$ reads

$$\chi_{trap}(\omega) = \frac{1}{k - i\omega\gamma} = \frac{\omega_0 + i\omega}{\gamma(\omega_0^2 + \omega^2)} \quad \omega_0 = \frac{k}{\gamma} \quad (3)$$

from which the PSD can be obtained:

$$S_{l,trap}(\omega) = \frac{2k_B T}{\gamma} \frac{1}{\omega_0^2 + \omega^2} \quad (4)$$

◇ Response function of a tube.

The dynamics of membrane tube fluctuations are quite complicated, and involve a combination of peristaltic (squeezing) modes, where the tube remains axisymmetrical but its radius changes, and bending modes, where the tube radius remains constant but its axis undulates (see [3]). Another complication is that the variation of the tube shape involves both membrane and solvent transfer between the tube and the vesicle from which it is pulled. Here, we use an approximate expression of the tube mechanical response function which focusses on the peristaltic modes and assumes membrane area is not transferred between the tube and the vesicle, as should be appropriate for the high frequency response. Accordingly [2]:

$$\delta l_\omega = \chi_{tube}(\omega) \delta f_\omega \quad , \quad \chi_{tube}(\omega) = \frac{\tanh q_\omega L}{q_\omega f_0} \quad , \quad q_\omega = \sqrt{\frac{\omega}{iD_r}} \quad , \quad D_r \equiv \frac{f_0}{32\pi\eta_i} \quad (5)$$

Here, f_0 is the average tether force, L is the average tube length and η_i the viscosity of the solvent inside the tube. the dynamics of tube relaxation is thus controlled by a “diffusion coefficient” D_r ,

which, taking $f_0 = 10$ pN and $\eta_i = 10^{-3}$ Pa.s, is of order $D_r \simeq 100 \mu\text{m}^2/\text{s}$. The response function χ depends on the tube length L , however, this dependency disappears in the limite $|q_\omega L| \gg 1$, that is in the limit of high frequency, where a perturbation at the end of the tube decays exponentially over a length $\sim 1/|q|$ much smaller than the tube length. The crossover frequency is given by $\omega_L = D_r/L^2$, which is of order 1 Hz for $L = 1 \mu\text{m}$.

◇ *PSD of a bead attached to a membrane tube*

The full response function χ is obtained considering that the tether acts on the bead in parallel with the visco-elastic environment (solve plus optical trap), so that:

$$\chi = \frac{1}{1/\chi_{\text{trap}} + 1/\chi_{\text{tube}}} = \frac{1}{\gamma(\omega_0 + i\omega + (1+i)\sqrt{\omega_t\omega})} \quad ; \quad \omega_t \equiv \frac{f_0^2}{2D_r\gamma^2} = \frac{4}{9\pi} \frac{f_0\eta_i}{\eta^2 R^2} \quad (6)$$

Finally, the SDP is

$$S_l(\omega) = \frac{2k_B T}{\gamma} \frac{1 + \sqrt{\omega_t/\omega}}{(\omega_0 + \sqrt{\omega_t\omega})^2 + (\omega + \sqrt{\omega_t\omega})^2} \quad (7)$$

This PSD is thus characterised by two parameters: the trap cutoff frequency ω_0 , and the “tube” frequency ω_t . using values of the trap stiffness $k = 40$ pN/ μm and for the bead size $R = 3 \mu\text{m}$, we find $\omega_0 = 4 \cdot 10^2$ Hz and $\omega_t = 10^2$ Hz. the figure below show the PSD for different values of ω_t/ω_0

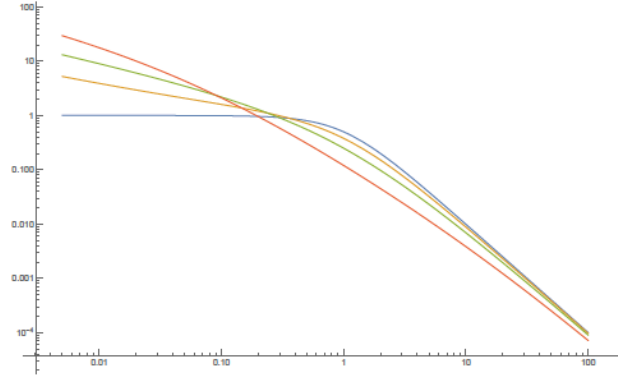


Figure 1: PSD, from Eq.(7), for different values of the ratio ω_t/ω_0 (0 - blue, 0.1 - orange, 1 - green, and 10 - red. the frequency is normalised by ω_0 .

The description aboves is able to explain the increase of the low-frequency PSD observed experimentally. However, it fails to explain the high frequency (constant) factor existing between the PSD with and without tube. A possible explanation for this increase is the coupling between longitudinal and normal modes for the bead motion brought about by the tube.

References

-
- [1] R. Kubo, “The fluctuation-dissipation theorem,” *Reports on Progress in Physics*, vol. 29, no. 1, pp. 255–284, 1966.
 - [2] P. Nassoy, D. Cuvelier, R. Bruinsma, and F. Brochard-Wyart, “Nanofluidics in cellular tubes under oscillatory extension,” *Eurohys. Lett.*, vol. 84, p. 18004, 2008.
 - [3] K. Gurin, V. Lebedev, and A. Muratov, “Dynamic instability of a membrane tube,” *Zh. Eksp. Teor. Fiz.*, vol. 110, pp. 600–610, 1996.
-

Annexe I

Calcul de l'amplitude des fluctuations d'une corde tendue

L'équation de d'Alembert

On a en fait réduit notre problème à l'étude d'une corde modèle, c'est-à-dire inextensible, de masse linéique μ , tendue uniformément horizontalement à la force constante T_0 , dont on va étudier les vibrations transversales.

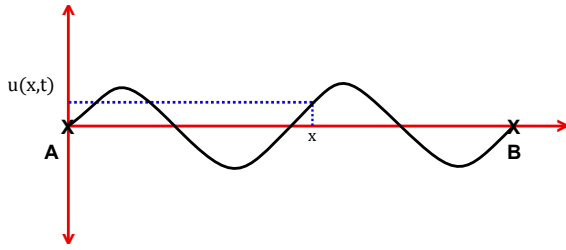


Figure 4.7 Schéma de départ de la modélisation.

On reconnaît un problème déjà rencontré par Jean le Rond d'Alembert au 18^{ème} siècle [Euler, 1980] dont l'équation s'écrit sous la forme :

$$\frac{\partial^2 u(x,t)}{\partial x^2} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 u(x,t)}{\partial t^2} \quad \text{Eq 4.1}$$

Avec c la célérité des ondes qui se propagent dans la corde qui vaut :

$$c = \sqrt{T_0/\mu} \quad \text{Eq 4.2}$$

Où μ est la masse linéique de la corde. Dans le cadre d'un tube de membrane, on peut complexifier l'Eq 4.2 pour prendre en compte le fait que le tube de membrane résiste à la courbure, et que le tube soit dans un environnement très visqueux avec beaucoup de frottements. Ainsi on a :

$$\mu \frac{\partial^2 u(x,t)}{\partial t^2} = T_0 \frac{\partial^2 u(x,t)}{\partial x^2} - EI \frac{\partial^4 u(x,t)}{\partial x^4} - \alpha \frac{\partial u(x,t)}{\partial t} \quad \text{Eq 4.3}$$

Où E le module d'Young du tube, I son facteur de forme pour le terme de courbure, et α est le coefficient de frottement dynamique du tube dans l'eau.

Le second terme du membre de droite (Eq 4.3) représente la résistance à la courbure de la corde, le troisième et dernier représente l'action des frottements sur la corde. En proposant des solutions sous la forme de combinaison linéaire de l'Eq 4.4, où $k \in \mathbb{C}$ et $(A, \omega, \varphi) \in \mathbb{R}^3$:

$$\underline{u}_{\text{solution}}(x, t) = A e^{i\varphi} e^{i(kx - \omega t)} \quad \text{Eq 4.4}$$

On peut tirer une relation de dispersion complexe qui relie ω, k et α .

$$k^2(T + EI k^2) = \mu\omega^2 + i\alpha\omega \quad \text{Eq 4.5}$$

Plus la tension est faible, plus les contributions des corrections apportées par la courbure et les frottements vont donc être importantes *a priori*. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser au premier ordre de cette équation, c'est-à-dire uniquement à l'Eq 4.1. La forme générale U de la solution de l'équation de d'Alembert qui vérifie les conditions limites établies, est connue et peut s'écrire comme la somme d'une infinité de modes indépendants :

$$U(x, t) = \sum_{n=1}^{\infty} \{a_n \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x)\} \quad \text{Eq 4.6}$$

Avec $(a_n, \varphi_n) \in \mathbb{R}^2$, un couple de constantes ; et $\omega_n = (n \pi c) / L$, $k_n = n \pi / L$, respectivement la pulsation et le nombre d'onde du mode n considéré, l'apparition des modes étant liée aux conditions limites de type Dirichlet.

Etude énergétique

L'énergie cinétique E_c de l'ensemble de la corde peut s'écrire sous la forme intégrale à partir de l'énergie cinétique linéique e_c de la portion de corde $\{x, x + dx\}$:

$$E_c = \int_0^L e_c dx = \frac{1}{2} \mu \int_0^L \left(\frac{\partial U(x, t)}{\partial t} \right)^2 dx \quad \text{Eq 4.7}$$

La puissance des forces extérieures conservatives sur une portion de corde s'écrit, vu que l'on ne considère dans ce cas que la tension de la corde :

$$P_{\text{ext}} = T_y(x + dx, t) \frac{\partial U(x + dx, t)}{\partial t} - T_y(x, t) \frac{\partial U(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial T_y}{\partial x} \frac{\partial U(x, t)}{\partial t} dx$$

Avec T_y la projection de la tension sur $\vec{e}_y$, qui dans l'approximation des petites déformations vaut :

$$T_y = T_0 \frac{\partial U(x, t)}{\partial x}$$

On peut alors appliquer le théorème de l'énergie cinétique à la portion de corde $\{x, x + dx\}$ en repartant de l'Eq 4.7 :

$$\frac{\partial e_c dx}{\partial t} = P_{ext} + P_{int}$$

Cela nous permet de calculer la puissance des forces intérieures :

$$\begin{aligned} P_{int} &= \frac{1}{2} \mu \frac{\partial \left(\frac{\partial U(x, t)}{\partial t} \right)^2}{\partial t} dx - \frac{\partial T_0 \frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \frac{\partial U(x, t)}{\partial t}}{\partial x} dx \\ &= \left(\mu \frac{\partial U(x, t)}{\partial t} \frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial t^2} - T_0 \frac{\partial U(x, t)}{\partial t} \frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial x^2} - T_0 \frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial t \partial x} \right) dx \\ &= \left(\left(\mu \frac{\partial U(x, t)}{\partial t} \right) \left(\frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial t^2} - c^2 \frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial x^2} \right) - T_0 \frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial t \partial x} \right) dx \\ &= \left(-T_0 \frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \frac{\partial^2 U(x, t)}{\partial t \partial x} \right) dx \\ &= \left(-\frac{T_0}{2} \frac{\partial \left(\frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \right)^2}{\partial t} \right) dx \end{aligned} \tag{Eq 4.8}$$

La puissance des efforts intérieurs s'écrivant, en introduisant l'énergie potentielle linéique e_p de la corde, sous la forme :

$$P_{int} = -\frac{\partial e_p dx}{\partial t} \tag{Eq 4.9}$$

On peut alors directement identifier l'énergie potentielle linéique en combinant les Eq 4.8-9 :

$$e_p = \frac{T_0}{2} \left(\frac{\partial U(x, t)}{\partial x} \right)^2 \tag{Eq 4.10}$$

L'énergie mécanique E totale de la corde peut alors s'écrire :

$$E = E_c + E_p = \int_0^L \left(\frac{1}{2} \mu \left(\frac{\partial U(x,t)}{\partial t} \right)^2 + \frac{T_0}{2} \left(\frac{\partial U(x,t)}{\partial x} \right)^2 \right) dx$$

Et on peut alors calculer l'énergie associée E_n à un mode n donné en introduisant la solution générale (Eq 4.6) :

$$E_n = \int_0^L \left(\frac{1}{2} \mu \left(\frac{\partial a_n \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x)}{\partial t} \right)^2 + \frac{T_0}{2} \left(\frac{\partial a_n \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x)}{\partial x} \right)^2 \right) dx$$

Ceci aboutit après simplification (on reconnaît la relation de dispersion à l'ordre 1) à :

$$E_n = \frac{(n a_n \pi)^2 T_0}{4 L} \quad \text{Eq 4.11}$$

Fluctuations :

On peut alors associer à chaque mode de vibration une énergie liée au bruit thermique d'après le théorème d'équipartition de l'énergie. D'où

$$E_n = \frac{(n a_n \pi)^2 T_0}{4 L} = k_B T \quad \text{Eq 4.12}$$

(k_b étant la constante de Boltzmann, T la température). Le terme a_n peut ainsi être évalué (au signe près) :

$$a_n = \pm \sqrt{\frac{k_b T L}{(n \pi)^2 T_0}} = \pm \frac{A}{n} \quad \text{Eq 4.13}$$

On va maintenant pouvoir calculer la moyenne temporelle du carré des déformations du tube ce que l'on pourra relier aux mesures expérimentales. On connaît désormais $U(x,t)$:

$$U(x, t) = \sum_{n=1}^{\infty} \pm \frac{A}{n} \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x)$$

d'où,

$$\langle (U(x, t))^2 \rangle_{temps} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t \left(\sum_{n=1}^{\infty} \pm \frac{A}{n} \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x) \right)^2 dt$$

La partie à intégrer est décomposable en une somme de carrés et une somme de termes croisés au signe indéterminé, noté $\pm^?$:

$$\begin{aligned} & \left(\sum_{n=1}^{\infty} \pm \frac{A}{n} \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x) \right)^2 \\ &= \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{A}{n} \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x) \right)^2 \\ &+ \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\substack{m=1 \\ m \neq n}}^{\infty} \pm^? \frac{A^2}{nm} \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x) \cos(\omega_m t + \varphi_m) \sin(k_m x) \end{aligned}$$

Eq 4.14

Si on se concentre d'abord sur la double somme avec le signe indéterminé, on s'aperçoit que le produit des cosinus peut être transformé en une somme de cosinus en utilisant les formules de Simpson [Simpson, 1799] pour donner un terme du type :

$$\begin{aligned} & \cos(\omega_n t + \varphi_n) \cos(\omega_m t + \varphi_m) \\ &= \frac{1}{2} (\cos(\omega_n t + \varphi_n - \omega_m t + \varphi_m) - \cos(\omega_m t + \varphi_m + \omega_n t + \varphi_n)) \end{aligned}$$

L'intégration de ce terme va donc donner une fonction bornée, ce qui va faire disparaître ce terme au passage à la limite $t \rightarrow \infty$. Il ne reste dans l'Eq 4.14 finalement plus que la somme des carrés qui peut se réécrire :

$$\sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{A}{n} \cos(\omega_n t + \varphi_n) \sin(k_n x) \right)^2 = \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{A}{n} \sin(k_n x) \right)^2 \left(\frac{1 + \cos(2(\omega_n t + \varphi_n))}{2} \right)$$

On peut faire ici la même remarque sur la fonction cosinus qui par intégration va donner une fonction bornée, ce qui simplifie encore le calcul de la moyenne temporelle du carré des déformations de la corde :

$$\langle (U(x, t))^2 \rangle_{temps} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_0^t \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{A}{n} \sin(k_n x) \right)^2 \left(\frac{1}{2} \right) dt \quad Eq 4.15$$

Ainsi, on a en intégrant l'Eq 4.15 :

$$\begin{aligned} \langle (U(x, t))^2 \rangle_{temps} &= \lim_{t \rightarrow \infty} \left(\frac{t}{2} \right) \frac{1}{t} \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{A}{n} \sin(k_n x) \right)^2 \\ &= \frac{1}{2} (A)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{\sin(k_n x)}{n} \right)^2 \end{aligned} \quad Eq 4.16$$

On peut dans les mesures que l'on a réalisées sur les tubes basse tension observer facilement les fluctuations du milieu du tube, en $x = \frac{L}{2}$, qui devraient donc, en suivant ce modèle, obéir à :

$$\begin{aligned} \left\langle \left(U \left(x = \frac{L}{2}, t \right) \right)^2 \right\rangle_{temps} &= \frac{1}{2} (A)^2 \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{\sin \left(\frac{n \pi L}{2} \right)}{n} \right)^2 \\ &= \frac{1}{2} (A)^2 \sum_{k=0}^{\infty} \left(\frac{1}{2k+1} \right)^2 \\ &= \frac{1}{2} (A)^2 \frac{\pi^2}{8} = \boxed{\frac{k_B T L}{4 T_0}} \end{aligned} \quad Eq 4.17$$

Cette relation correspond au cas simplifié de la relation de dispersion écrite à l'Eq 4.3, sans les termes de correction liés à la rigidité du tube et de la viscosité du milieu. Pour le terme de rigidité, on a $EI = \pi \kappa r_{tube}$ de l'ordre de 10^{-30} Pa, donc on va continuer à négliger ce terme. Et pour le cas des frottements, ceux-ci ne vont pas perturber les énergies calculées à l'équilibre. On prendra donc par la suite l'Eq 4.17 comme bonne approximation du problème considéré.

Annexe J

Formations de l'Ecole Doctorale

-

Physique Île de France

Cancer et Cassandre

Le cancer est un sujet grave. C'est moche, ça tue,
Tes cellules se dérèglent, et hop c'est foutu.
Elles vont plus vite, se divisent en un éclair,
Plusieurs migrations plus tard, c'est la galère.

Pour pouvoir les éradiquer, et guérir,
On a besoin de chercher à s'instruire.
En allant et en se divisant rapidement,
Les cellules cancéreuses changent énormément.

Leur contour et leur forme évoluent sans cesse,
Ce qui fait subir à leur squelette quelques rudesses.

Pour caractériser et mesurer ses tensions,
C'est là qu'interviennent mes manipulations :
Je tire, je casse, je tente de comprendre.
Dommage que le cancer, joue les Cassandre.

(Poème réalisé dans un exercice de vulgarisation scientifique au cours d'une des excellentes formations doctorales que j'ai pu suivre au CFDIP-ED PIF)

Annexe K

Revue

How cellular membrane properties are affected by the actin cytoskeleton

J. Lemièr^e, F. Valentino^{a,b,c}, C. Campillo^d, and C. Sykes^{a,b,c}

^a Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 168, 75005 Paris, France.

^b Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.

^c Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 5 rue Thomas-Mann, 75205 Paris, France.

^d Université Evry Val d'Essonne, LAMBE, Boulevard F Mitterrand, Evry 91025, France.

^e Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Nanobiology Institute, Yale University, New Haven, CT, USA

I.	Abstract.....	4
II.	Introduction.....	4
III.	From cells to reconstituted systems	5
IV.	Biomimetic membrane systems	6
V.	The actin cytoskeleton	8
VI.	Building a reconstituted actin cortex inside liposomes	9
VII.	Mechanical properties of membranes and cells	10
VIII.	How membrane mechanics are affected by their link to the cytoskeleton	11
IX.	Role of the actin cytoskeleton on membrane domain organization	12
X.	Conclusion	13
XI.	Acknowledgements.....	13
XII.	Bibliography	14

I. Abstract

Lipid membranes define the boundaries of living cells and intracellular compartments. The dynamic remodelling of these membranes by the cytoskeleton, a very dynamic structure made of biopolymers, is crucial in many biological processes such as motility or division. In this review, we present some aspects of cellular membranes and their link to the actin cytoskeleton. In particular, we focus on the actin cortex, a thin layer of actin filaments polymerizing at the cell membrane, which controls cell shape changes. We show that, in parallel with the direct study of membranes and cytoskeleton *in vivo*, biomimetic *in vitro* systems allow reconstitution of biological processes in a controlled environment. In particular, we show that liposomes, or giant unilamellar vesicles, encapsulating a reconstituted actin network polymerizing at their membrane are suitable models of living cells and can be used to decipher the relative contributions of membrane and actin on the mechanical properties of the cellular interface.

II. Introduction

Cell membranes are made of phospholipids arranged in a 5 nm thick bilayer. On the one hand, they constitute the periphery of cells acting as a natural barrier between cells and their environment. On the other hand, they separate organelles from the cytosol inside cells. In fact, the plasma membrane at the periphery of cells constitutes only 2% of the whole membrane constituent of cells, the remaining 98% being inside cells [1]. Thanks to this compartmentalization by membranes, cells separate different and very specific bio-reactions meanwhile controlling the production, efficiency and localization of biosynthesis. Despite the fact that cell membranes share the same global structure, their physical properties may differ, namely fluidity, elasticity or dynamical behaviour. Those differences rise from their internal composition, but also result from the activity of the cytoskeleton activated through proteins anchored at the plasma membrane. In this review, we will describe the state-of-the-art knowledge on lipid membrane mechanical properties, and the one of the actin cytoskeleton. We will then present some emerging concepts that membrane properties (mechanics, organization) are affected by the presence of a cytoskeleton. This is true in cells [2], and evidenced by the use of reconstituted systems of membranes at the surface of which cytoskeleton assembly is reproduced.

III. From cells to reconstituted systems

Eukaryotic cells have the ability to maintain their structure and integrity but can also change their shape all along their life [3]. These shape changes occur during cell functions such as traffic, motility or cytokinesis. Cell deformations are due to cytoplasmic biopolymers or filaments called cytoskeleton, which are tightly coupled to the cellular membranes. The cytoskeleton continuously self-assembles and disassembles inside cells using the biochemical energy of the cell: adenosine tri-phosphate (ATP) that becomes adenosine di-phosphate (ADP). It insures a dynamic cell architecture allowing cell shape changes during their life span or in reaction to environmental cues. The cytoskeleton is divided into three families. The one we will be interested in in this review is called actin filaments or microfilaments. Actin filaments assemble from their monomeric form – also called G-actin for globular actin. They are 4-7 nanometer thick and are responsible for most of the process of cell motility. One other family is microtubules which are hollow filaments, made of 13 protofilaments, largely used as tracks in cell trafficking [4]. The last family is intermediate filaments, less studied, but known to have a role in cell mechanics and in particular the nucleus envelope [5].

The membrane is the site of many biochemical reactions, in particular for the activation of actin filament polymerization. Even though there is more and more evidence that cell migration adapts to its environment [6,7] we can still break down cell motility in a three-step mechanism: 1) the membrane at the cell front activates actin polymerization and is pushed by the assembly of actin into filaments, 2) the cell adheres to the surrounding substrate, and 3) the cell rear is contracted by the action of molecular motors that slide on actin filaments situated underneath the plasma membrane, resulting in tension build-up.

Actin filament dynamics and actin network mechanics have been largely studied for decades in bulk samples in the context of polymer physics [8]. The mechanical properties of actin networks were found to be very striking, as they depend on the time scale at which samples are observed. Indeed, whereas actin networks are elastic at short times ($< a$ few seconds), they have the property to flow like a liquid over longer times. This behaviour is called "visco-elastic" and is also found in cells. Moreover, tremendous progress has been made when it became possible to reconstruct *in vitro* a dynamic actin network on deformable surfaces which mimic what happens at the plasma membrane of cells [9].

The objective of molecular biology is to identify the whole pool of components involved in a biological process and to understand their function. Given the complexity of a cell, a simplification of the system is an interesting way to approach the problem. There are two ways to do so:

The first approach consists in overexpressing, inhibiting or even removing elements known to be involved in cell mechanics and motility. The cell is then "simplified" little by little. By observing and measuring the effect of these alterations, biologists can infer the role of each protein. This approach is named "top-down" and is the most traditional of cell biologists. One advantage of this method is that it uses the whole cell and it stays close to the complex reality. One disadvantage is that removing one component in a cell may alter others and therefore lead to attributing a wrong function to this component.

The second approach is the other way round and hence is named "bottom-up" approach. It is inspired from the famous quote of the physicist Richard Feynman: "what I cannot create I do not understand", and consists in recreating the behaviour of cells by successive addition of purified, identified components. This method allows for the

characterization of the precise role of each constituent and their interaction between each other. Building a reconstituted system, also named "biomimetic system", is designed to reproduce one module of the cell at a time. This biomimetic approach leads to a perfectly controlled experimental system and allows for quantitative measurements under fixed conditions from which theoretical models can be developed, and physical or mechanical predictions can be validated.

Nowadays, biomimetic systems for the study of actin polymerization form a very large family and use multiple experimental techniques depending on the question one would address [10]. The story of these bottom-up approaches started with the observation, the study in cell extracts and then the reconstitution with pure protein solution of the motility of the bacteria *Listeria monocytogenes* [11]. Briefly, these bacteria produce at their surface the ActA protein which is able to hijack the actin machinery in order to propel them through the cytoplasm at a speed $v = 1.5 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$. The force provided by this dynamic actin network is strong enough to enable the bacterium to deform the plasma membrane of its host cell and penetrate into a neighbour cell without crossing the external cellular media where it could be detected by the immune system [12]. The ActA protein was found to activate the Arp2/3 complex, which induces the formation of a branched actin network (see section V for more details). The next step to breakdown the mechanical forces and the biochemistry associated in this behaviour was the reconstitution of this system in controlled conditions. The measurement provided by biophysicists made possible to decipher the biochemical and physical parameters involved in this process. Firstly, to control the geometry and the surface density of the actin activator, *Listeria* was replaced with polystyrene beads coated with the ActA protein. Secondly, to analyse the role of proteins involved in the force production mechanism, cell extract solution was replaced by solutions of purified proteins or even truncated proteins. These experiments and more recent variations nail down the contribution of the minimal proteins as well as the role of their domains or the force produced by actin polymerization [13–16]. Indeed, the dendritic actin network created by the ActA protein is similar to the structure of the actin cortex and lamellipodium (see section V for more details) important structures of motile mammalian cells and known to also produce force. This analogy led progressively to new *in vitro* systems mimicking mammalian actin structures on model membranes.

IV. Biomimetic membrane systems

Model membranes, made on the cell model, by self-assembly of lipids, have been extensively characterized mechanically and dynamically. Usually, a lipid is broadly defined as a small molecule about $0.7 \mu\text{m}^2$ and 2.5 nm long [17] made from insoluble organic elements. Lipids share an amphiphilic structure, with a hydrophilic head and one or two hydrophobic tails. The hydrophobic tails of lipids face the inside of the bilayer whereas their hydrophilic heads face the outside aqueous environment (Fig. 1A). Such chemical properties explain the structure formed by lipids when they come in contact with an aqueous environment. Moreover, depending on the ratio between the area of the head and the shape of the tail that can be composed of two chains with different lengths, self-assembly can result in various shapes. For example, a conical lipid population – *ie* with a large head compared to the tail – will favour the formation of spherical micelles whereas a cylindrical lipid population – *ie* a small head group and a double-chained tail with the same surface area – will be organized in planar bilayer [18]. Amid those different shapes two are commonly used in biophysics to model plasma membranes: the liposome and the supported bilayer. [19]. Liposomes (also called Giant Unilamellar Vesicles or GUVs) are spherical membranes that mimic the plasma membrane of cells, providing a closed cell-like structure with a diameter of the order of a few

tens of microns. Note that, for cell biologists, vesicles rather refer to intracellular compartments of a few hundreds of nanometre in diameter. Supported bilayers are often used to study membrane-protein interactions, are obtained by the deposition of small unilamellar vesicles on a substrate, and have the advantage of being planar and easily imaged by optical microscopy.

Liposomes can be produced by different methods. The simplest one consists in rehydration of a dry lipid mixture in bulk [20]. Due to the spontaneous organization of lipids in aqueous solution they form a broad range of structures among which one can find micelles, multilamellar vesicles and liposomes. However, because this method provides a small ratio of liposomes compare to the other structures, new methods were designed to increase the yield (electroformation method), control the size of liposomes (microfluidics fabrication) and encapsulate proteins (inverted emulsion) as mainly used methods. Whatever method one would consider they rely on three steps: lipid hydration and self-organization, swelling of the lipidic structures into bigger ones and finally separating from each other.

Electroformation relies on liposome swelling by placing an aggregate of dried lipids under an electric field in solution [21]. This method gives a very good yield in terms of quantity of giant unilamellar liposomes. Nevertheless, this method can only be used with low-salt solutions at a concentration smaller than 10 mM [21], *ie*, nonphysiological conditions that are not suitable for proteins. The buffer solution needs to be changed before adding any proteins. This final step is usually done by dilution of the solution containing liposomes into a more physiological buffer –note that the high yield of liposomes allows for dilution factor around 100. However, recent methods using preformed smaller unilamellar vesicles as lipid deposits on platinum electrodes allows for the formation of GUVs in a physiological pertinent buffer (~100mM in salt) [22,23].

The inverted emulsion technique is based on a water/oil emulsion sedimented through a lipid monolayer [24]. It can be used to encapsulate proteins and to form asymmetric bilayers – *ie* when the inner membrane composition is different from the outer one [25]. This technique used with physiological buffers has roughly the same yield as electroformation. This method does not need an electric field and proteins can be encapsulated with only pipetting, avoiding any denaturation [26]. Nevertheless, the yield decreases when more complex solutions containing proteins are encapsulated, maybe due to the amphiphilic properties of proteins that might modify the physical properties of the interface, and some small quantity of oil is trapped inside the bilayer.

Microfluidics jetting technique is based on the same idea as the inverted emulsion but in an all-in-one small chip allowing for higher control of parameters during the formation of liposomes. This integrated technique pulses at high speed an aqueous solution at the surface of a preformed planar lipid bilayer or lipid/oil solution, which creates a deformation that gives rise to liposomes released in an aqueous buffer. This method creates monodisperse liposomes, with a tuneable lipid composition. Proteins can be encapsulated and potentially creates compartmentalization [27–29]. However, this method requires specialized equipment and does still leave small quantity of oil inside the bilayer, which can affect membrane properties.

V. The actin cytoskeleton

Actin is a dynamic helical biopolymer of 4-7 nm thick that assembles from monomers in the cytoplasm. The actin cytoskeleton is made of the assembly of actin filaments, and plays a major role in cell mechanics, force generation and motility [30]. The actin cytoskeleton is able to reinforce or deform the plasma membrane of cells (Fig. 1 and 2). Over the years, the actin cytoskeleton has been of great interest especially because of its role in metastasis. Indeed, invasion of cancer cells requires to travel through tissues, and tumour cells get this migratory phenotype by alterations in the actin cytoskeleton dynamics [31]. The mechanical properties of the cytoskeleton depend on its structure sustained by a range of proteins named Actin Binding Proteins (ABP). The structural organization of these proteins is highly dynamic and gives rise to macroscopic physical properties of the cytoskeleton from viscous to plastic or rigid [32,33]. *In vivo* the G-actin concentration in the cytosol is around 300 μM , which is very high and far beyond the critical concentration $C_c=0.2 \mu\text{M}$ that causes self-polymerization of actin in an ionic solution. Despite this huge difference, all the actin is not polymerized in the cytosol thanks to other proteins able to sequester actin monomers from the pool available and release them only when required. Sequestration of G-actin prevents random nucleation of actin, and nucleators of polymerization provoke local growth of actin filaments through polymerization of monomers.

In a two dimensional environment the leading edge of motile cells is composed of two main actin structures: the lamellipodium and the filopodia (Fig. 1B) [34]. Filopodia were observed long ago by Ramon y Cajal in 1890 [35]. They form thin ~ 200 nm and micrometre long finger-like protrusions. They contain long and parallel bundles of actin filaments organized in the same direction. These dynamics structures sense the environment and are able to create adhesion with other cells or the extracellular media. Depending on the stress they undergo, they can grow, contract, pull or even push [36]. The mechanism governing their formation is still debated and seems to rely on two main actin nucleators – namely the Arp2/3 complex and formins – depending on the presence or not of focal adhesion [37,38]. The lamellipodium is a planar structure of about 200 nm thick and few micrometre large. This 2D structure is made out of a dense dendritic actin network well organised with a distinctive 70 degree angle between two branched filaments due to the Arp2/3 complex which is the main nucleator of this network [39,40]. The Arp2/3 complex creates a new actin filament that branches from a pre-existing filament also called primer. The polymerization of that kind of branched network promoted by the Arp2/3 complex could then be quickly out of control without fine-tuning mechanisms *in vivo* [41]. Not only the Arp2/3 complex needs a primer but also a nucleation promoting factor (NPF). NPF are a family of approximately a dozen of proteins, including the protein WASp (for Wiskott-Aldrich Syndrome protein) or its neuronal homologue N-WASp and SCAR/WAVE [42]. Even if there are different actin-based architectures involved in cell motility due to different ABP, they are all organized according to the same control cascade scheme. Actin monomers assemble into networks at the membrane thanks to a nucleator (the Arp2/3 complex or a formin), those NPFs being locally switched on by an activator initially in an inactivated state. NPF activated state is itself triggered by lipids as L- α -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (also named $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) and membrane bound proteins. Therefore, there is a tight link between membranes and the actin cytoskeleton that together determine many aspects of cellular mechanics.

VI. Building a reconstituted actin cortex inside liposomes

A crucial step in the biomimetic approach of actin biophysics is therefore to build a model system of the cortex from purified cellular constituents: artificial liposomes encapsulating a dynamic actin network that polymerizes at their inner membrane.

Several works were devoted to the encapsulation of actin monomers which polymerize into filaments inside the lumen of GUVs [43], but a striking feature of the cortex is that dynamic actin polymerization is nucleated at the plasma membrane. Therefore, Pontani *et al.* developed a strategy where activators of the Arp2/3 complex are attached to the inner leaflet of a GUV that contains the minimal protein mixture to recreate dynamic actin polymerization [44]. They use the subdomain VVCA from N-WASP that includes a His-tag and binds to the membrane through a Histidine-Nickel link thanks to 5% of lipids with a nickel head. The GUVs also encapsulate a mixture of G-actin, Arp2/3, gelsolin, ADF-cofilin and profilin in a buffer containing low salt and low ATP, thus inducing no actin polymerization. A passive pore (Fig. 1C) was then added into the membrane to trigger dynamic actin polymerization specifically localized at the internal leaflet by allowing salt and ATP to enter. The resulting dynamic cortex has a thickness between 100 and 500 nm, close to the one in living cells. This reconstituted actin system has then been used for several studies on cortical mechanics that we will detail below.

Indeed, the α -hemolysin pore is a powerful tool that self assembles into membrane, makes liposomes selectively permeable to small molecules allowing small molecules such as ATP and salts to enter the GUVs while confining proteins inside the liposome (molecular mass cut-off of 3kDa). Moreover, it has been shown that the adsorption of α -hemolysin into the membrane remains constant under variable liposome preparation condition (see section IV), but depends on the lipid composition [45] and the unilamellarity of the liposome [29].

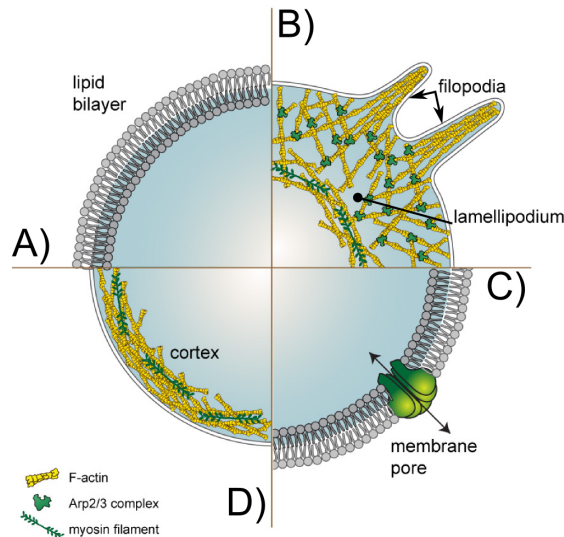


Figure 1: Schematic representation of membrane, transmembrane protein and actin architectures. A) A bare phospholipid bilayer, all lipids heads facing the aqueous solution. B) Filopodia extending beyond the lamellipodium and their actin structures formed close to the plasma membrane at the leading edge of migrating cells. C) Insertion of membrane pores allows transportation of small molecules through the bilayer. D) The actin cortex located underneath the plasma membrane with three myosin filaments.

VII. Mechanical properties of membranes and cells

Initially membranes were mostly considered as passive structures. However, in the past decades, studies highlight their role in signalling, mechanical feedback and organization of the cytoskeleton architecture. Because of the strong interaction in cells between membranes and proteins, measuring the sole membrane properties is challenging since it is difficult to isolate the membrane from the cytoplasmic constituents. This is the case for the actin cortex, a thin shell of actin that lies underneath the plasma membrane (Fig. 1D). Moreover, spike-like structures or filopodia appear as fingers of membrane formed by the growth of filaments, just like when a hand enters into extensible gloves (Fig. 1B & 2). To study membrane properties, biophysicists found a way to probe simplified systems mimicking a bare cell membrane made out of lipids and enclosing an internal aqueous solution that could be different from the external solution: the liposome (see section IV). Liposomes are indeed able to reproduce multiple parameters of real cells: their size with a diameter about 10 μm , and the bilayer configuration. Their lipid composition can be tuned, and components can be encapsulated in the internal solution.

The two major mechanical properties that matter when it comes to studying membrane mechanics and deformations, are the membrane tension σ and the bending modulus κ of the membrane. The latter depends on the lipid composition and indicates how the membrane resists to curvature. It is in the order of $\kappa = 10^{-19}$ N.m or $\sim 10 - 20 k_B T$ [46], only few times higher than the thermal fluctuation energy, therefore explaining why floppy membranes show oscillations at room temperature. This is also the case for red blood cells that are known to "flicker" when healthy, as their membrane is floppy enough to show visible fluctuations by simple thermal energy. The membrane tension parameter indicates the condition of the membrane under 2D stress; it will increase if the membrane is taut. Membrane tension ranges between $\sigma = 10^{-6}$ and 10^{-3} N/m. This large range of value is due to the large variety of membranes, how they are produced as spheres, and, in cells, how the membrane is interacting with the rest of the cell, namely the cytoskeleton. Pure membrane tension in L929 cells was elegantly measured by Tinevez and co-workers [47] by destructing the cytoskeleton and aspirating with micropipettes, and found to be $(3.91 \pm 0.42) \times 10^{-5}$ N/m, one order of magnitude greater than tension in pure liposomes, maybe due to residual tension exerted by an erythrocytic-like cytoskeleton. However, total tension of cells does not result from the sole contribution of the membrane. In fact, the actin cortex situated right underneath the plasma membrane can be put under tension by actin dynamics (polymerization and depolymerization) and molecular motors that pull on the actin filaments. This effect results in a tension called "cortical tension". Total cell tension is therefore the result of the contribution of cortical and membrane tensions and ranges from 5×10^{-5} N/m in fibroblast progenitor cells [48] or dividing mouse oocytes [49], and up to 4×10^{-3} N/m for *Dictyostelium* [50].

There is a subtle link between cell motility and membrane mechanics: as the actin network pushes the membrane forward at the leading edge of the cell, there is a reciprocal interaction between membrane mechanics, in particular tension, and actin dynamics [51]. In the crawling *C.elegans* sperm cells, whose motility relies on an analogue of actin called Major Sperm Protein, an increasing membrane tension tends to favour cell crawling by aligning cytoskeletal filaments [52]. Moreover, in cells that move by "blebbing" mechanisms (the projection of membrane bulges detached from the underlying cortex), the membrane-cortex attachment plays a crucial role on motility [53].

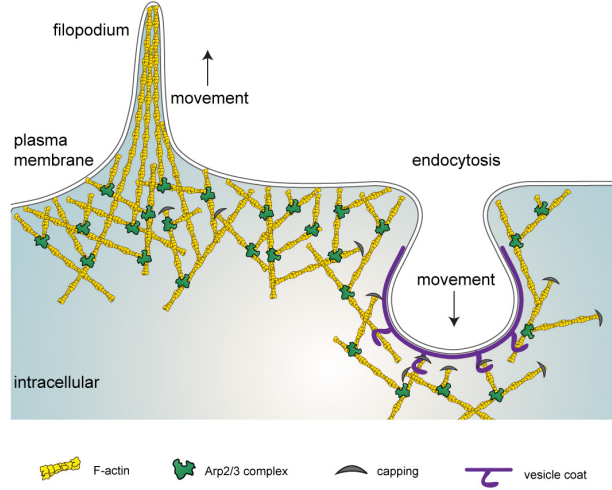


Figure 2: Schematic representation of distinct membrane deformations and their actin organization. The left part represents a filopodium in which long and parallel bundles of actin deform the membrane outwards. The right part represents the formation of an endocytic vesicle where an actin meshwork, with the help of coat proteins, deforms the membrane inwards.

VIII. How membrane mechanics are affected by their link to the cytoskeleton

In living cells, the plasma membrane is tightly bound to the underlying cortex. Several biological processes imply detaching the membrane from the cortex, such as endocytosis (Fig. 2) and bleb formation where the contribution of membrane-cortex attachment is shown to dominate [54]. The physics of this detachment can be assessed by pulling membrane nanotubes from living cells [55]. Membrane nanotubes are cylinders made of lipid membrane that form when a flat membrane is submitted to an orthogonal point force. The force f_0 required to hold a membrane nanotube depends on membrane properties and on the membrane-cortex adhesion energy W . Yet, it is independent of the nanotube length: $f_0 = 2\pi(2\kappa(\sigma + W))^{1/2}$, where κ is the membrane elastic bending energy (≈ 10 - 20 $k_B T$) and σ its tension (from 10^{-6} to 10^{-3} N/m). Therefore, measuring f_0 provides information on the physics of the ensemble plasma membrane and cortex.

Tube pulling experiments can be done in a static way: membrane tubes are formed and then maintained at a constant length. To further study the interactions between the membrane and the cortex, dynamic tube pulling experiments are performed: tube length is varied at a constant velocity, forcing the flow of membrane lipids in the nanotube, while the force to hold the tube is measured. In this case, the force is larger than f_0 and depends on the extrusion velocity. This effect is classically explained by the friction of the membrane lipids on the spots where the cortex is anchored in the membrane [56].

Liposomes encapsulating an actin cortex allow deciphering the respective roles of plasma membrane and cortex on the dynamics of the ensemble. To do so, dynamic nanotube pulling experiments can be used on reconstituted systems [57]. For cell membranes in the absence of the cytoskeleton, or pure membranes that contain traces of oil inside the bilayer, the force necessary to maintain the tube depends on the velocity at which the tube is pulled, whereas for pure lipid membranes, this force is constant. The different rheology of cell membranes is

attributed to the presence of proteins or inclusions in the membrane. The presence of an actin cortex induces a supplemental contribution to this effect.

Nanotube extrusion on reconstituted systems was also studied with hydrodynamic techniques: liposomes are attached to an adherent needle and submitted to a liquid flow to exert a Stokes force and form a nanotube between the vesicle and the needle [58]. The tube extrusion dynamics has two phases, corresponding respectively to a rapid elastic extension followed by a slower elongation at constant rate. The first step corresponds to an increase in membrane tension due to flow of lipids inside the tube. In presence of an actin cortex the tubes are shorter than for bare liposomes at similar force. It shows that only patches of lipids are free to flow inside the tube, their movement being restricted by the links with the underlying cortex as observed in living cells [59,60]. Again with this technique, the presence of the actin layer attached to the membrane changes the mechanical behaviour of the membrane.

Finally, the actin cortex also affect the adhesion dynamics of liposome enclosing an actin cortex [61]. Their spreading on adherent substrates is monitored by Reflection Interference Contrast Microscopy (RICM) that provides the evolution of the spreading area over time $A(t)$. The spreading behaviour depends on the connectivity of the reconstituted actin cortex: when the cortex has a low connectivity, the vesicles spread as bare vesicles with $A(t) \sim t^2$. Oppositely, vesicles comprising a connective cortex spread much slower with $A(t) \sim t$. Their spreading is limited by viscous dissipation in the reconstituted cortex and recapitulates the early adhesion dynamics of living cells.

IX. Role of the actin cytoskeleton on membrane domain organization

The spatial organization of cell membranes plays a critical role in functions such as signalling or trafficking [62]. In particular, heterogeneities in its lipid composition and thus physical state (liquid disordered or liquid ordered) affect biological processes [63]. Whereas it has been recognized that some lipid mixtures in membranes can spontaneously provoke domain formation through thermodynamic motion, how these domains can change dynamically for cell fate is a question that has been addressed both in cells and in reconstituted systems.

Since the actin cytoskeleton is a dynamic structure linked to biological membranes, it is a good candidate as a modeller of membrane domains. Indeed, the ability of a dynamic actin network to alter membrane domain properties has been demonstrated by [64] using model systems of pure membranes and a reconstituted cytoskeleton. In this work, the authors use liposomes made of a ternary lipid (DOPC/DPPC/Cholesterol) mixture containing PtdIns(4,5)P₂ that undergo phase separation in two separated lipid phases below a temperature T_{misc} . The polymerization of a dendritic Arp2/3 complex-based actin network is triggered at the membrane by attaching N-WASP to PtdIns(4,5)P₂ lipids. In these conditions, an increase of T_{misc} is observed in the presence of actin, showing that actin stabilizes the membrane domains. The same stabilization effect was observed when liposomes were prepared in a homogenous state slightly above the transition temperature.

In cells, actin dynamics is able to alter membrane organization for the scission of membrane tubules in clathrin-independent endocytosis [65]. Shiga toxin binds to glycosphingolipids and induces lipid-packing modification, finally resulting in tubular membrane invaginations in cells and GUVs. These tubular membranes undergo scission in the presence of actin dynamics, in cells and in reconstituted systems of membranes carrying a dynamic

cytoskeleton, most probably by inducing membrane reorganization or by membrane scaffolding effect that sensitizes tether membranes for pulling-force-induced scission [66]. Also, the free diffusion of lipids in the plasma membrane of cells in the presence of the attached cytoskeleton is restricted to corrals, or closed domains where the lipids freely diffuse. These corrals are restricted by the anchors of the cytoskeleton in the membrane [60].

X. Conclusion

Our goal in this short review has been to highlight the strong interaction between the actin cytoskeleton and the plasma membrane; in other words between biochemistry and cell mechanics.

Experiments mimicking the confinement are a crucial step to break down the respective roles of membrane and the actin cytoskeleton in cell mechanics. For example reproducing the actin cortex in controlled conditions paves the way for a better understanding of the role of each binding protein in cell tension. Stripped-down experiments can also elucidate the factors responsible for cell migration; thereby opening the door for development of anticancer drugs targeting the actin cytoskeleton pathway involved in metastatic cell migration.

Even though we introduced at the beginning of this review the other constituents of the eukaryotic cells cytoskeleton, such as microtubules and microfilaments we did not mention the prokaryotic cytoskeleton (FtsZ, FtsA for the bacterial cytoskeletal structure as an example); that would have been beyond the scope of this review. However, it is known that the cell structure relies on those constituents and that they can interact with the actin cytoskeleton. Therefore mimicking a more complex cytoskeleton putting together actin and microtubule for example could lead to rewarding discoveries in synergy between cell organization, trafficking and migration.

Building artificial systems based on the encapsulation of purified component is a natural progression from the biochemist bulk studies. Reproducing the spatial confinement, due to lipid bilayer, of cytoskeleton components already helped to better understand the interplay between geometrical restrictions and biochemical reactions. We are still in the early stage of the biomimetic field and one can already foresee that the addition of more complex protein mix may lead to a better understanding of more complex functions of living cells such as cell division, migration and self reproduction.

XI. Acknowledgements

We acknowledge Dr. Agnieszka Kawska at IlluScientia.com for the figures. This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR), grant ANR 09BLAN0283 and ANR 12BSV5001401, and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), grant DEQ20120323737.

XII. Bibliography

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Molecular Biology of the Cell, 4th ed., 2002. <http://www.amazon.com/Molecular-Biology-Fourth-Bruce-Alberts/dp/0815332181>
<http://www.amazon.co.uk/Molecular-Biology-Cell-Bruce-Alberts/dp/0815341067>.
- [2] R. Raghupathy, A.A. Anilkumar, A. Polley, P.P. Singh, M. Yadav, C. Johnson, S. Suryawanshi, V. Saikam, S.D. Sawant, A. Panda, Z. Guo, R.A. Vishwakarma, M. Rao, S. Mayor, Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins, *Cell*. 161 (2015) 581–594. doi:10.1016/j.cell.2015.03.048.
- [3] E. Paluch, C.-P. Heisenberg, Biology and physics of cell shape changes in development., *Curr. Biol*. 19 (2009) R790–R799. doi:10.1016/j.cub.2009.07.029.
- [4] J.P. Caviston, E.L.F. Holzbaur, Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport, *Trends Cell Biol*. 16 (2006) 530–537. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.002.
- [5] D.A. Starr, Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus, *Mol. Biosyst*. 3 (2007) 583–9. doi:10.1039/b703878j.
- [6] W.-C. Hung, S.-H. Chen, C.D. Paul, K.M. Stroka, Y.-C. Lo, J.T. Yang, K. Konstantopoulos, Distinct signaling mechanisms regulate migration in unconfined versus confined spaces., *J. Cell Biol*. 202 (2013) 807–24. doi:10.1083/jcb.201302132.
- [7] P. Friedl, K. Wolf, Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms., *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003) 362–74. doi:10.1038/nrc1075.
- [8] M.L. Gardel, J.H. Shin, F.C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira, D.A. Weitz, Elastic Behavior of Cross-Linked and Bundled Actin Networks, *Science* (80-.). 304 (2004) 1301–1305. doi:10.1126/science.1095087.
- [9] J. Plastino, C. Sykes, The actin slingshot., *Curr. Opin. Cell Biol*. 17 (2005) 62–66. doi:10.1016/j.ceb.2004.12.001.
- [10] M.D. Vahey, D.A. Fletcher, The biology of boundary conditions: Cellular reconstitution in one, two, and three dimensions, *Curr. Opin. Cell Biol*. 26 (2014) 60–68. doi:10.1016/j.ceb.2013.10.001.
- [11] R. Cáceres, M. Abou-Ghali, J. Plastino, Reconstituting the actin cytoskeleton at or near surfaces in vitro, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res*. 1853 (2015) 3006–3014. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.07.021.
- [12] G.A. Dabiri, J.M. Sanger, D.A. Portnoy, F.S. Southwick, *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 6068–6072. doi:10.1073/pnas.87.16.6068.
- [13] M.D. Welch, a Iwamatsu, T.J. Mitchison, Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*, *Nature*. 385 (1997) 265–269. doi:10.1038/385265a0.
- [14] T. Pujol, O. du Roure, M. Fermigier, J. Heuvingh, Impact of branching on the elasticity of actin networks, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 109 (2012) 10364–10369. doi:10.1073/pnas.1121238109.
- [15] M. Bussonnier, K. Carvalho, J. Lemièrre, J.-F. Joanny, C. Sykes, T. Betz, Mechanical detection of a long-range actin network emanating from a biomimetic cortex., *Biophys. J*. 107 (2014) 854–62. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.008.
- [16] V. Caorsi, J. Lemièrre, C. Campillo, M. Bussonnier, J. Manzi, T. Betz, J. Plastino, K. Carvalho, C. Sykes, Cell-sized liposome doublets reveal active tension build-up driven by acto-myosin dynamics, *Soft Matter*. (2016). doi:10.1039/C6SM00856A.
- [17] S.M. Johnson, The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonication phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*. 307 (1973) 27–41. doi:10.1016/0005-2736(73)90022-9.

- [18] J.N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, Intermol. Surf. Forces. 450 (1992) 1–18. doi:10.1103/PhysRevB.72.024417.
- [19] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124. doi:10.1038/nrm2330.
- [20] K.S. Horgan, D.J. Estes, R. Capone, M. Mayer, Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength., *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 1810–1819. doi:10.1021/ja805625u.
- [21] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 303–311. doi:10.1039/dc9868100303.
- [22] P. Méléard, L.A. Bagatolli, T. Pott, Giant Unilamellar Vesicle Electroformation. From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions, *Methods Enzymol.* 465 (2009) 161–176. doi:10.1016/S0076-6879(09)65009-6.
- [23] M. Garten, S. Aimon, P. Bassereau, G.E. Toombes, Reconstitution of a transmembrane protein, the voltage-gated ion channel, KvAP, into giant unilamellar vesicles for microscopy and patch clamp studies, *J Vis Exp.* (2015) 52281. doi:10.3791/52281.
- [24] S. Pautot, B.J. Frisken, D.A. Weitz, Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion, *Langmuir.* 19 (2003) 2870–2879. doi:doi:10.1021/la026100v.
- [25] J. Lemièrre, K. Carvalho, C. Sykes, Cell-sized liposomes that mimic cell motility and the cell cortex., *Methods Cell Biol.* 128 (2015) 271–85. doi:10.1016/bs.mcb.2015.01.013.
- [26] M. Chiba, M. Miyazaki, S. Ishiwata, Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method, *Biophys. J.* 107 (2014) 346–354. doi:10.1016/j.bpj.2014.05.039.
- [27] K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 12608–12609. doi:10.1021/ja074029f.
- [28] J.C. Stachowiak, D.L. Richmond, T.H. Li, A.P. Liu, S.H. Parekh, D.A. Fletcher, Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 4697–4702. doi:10.1073/pnas.0710875105.
- [29] S. Deshpande, Y. Caspi, A.E. Meijering, C. Dekker, Octanol-assisted liposome assembly on chip, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10447. doi:10.1038/ncomms10447.
- [30] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Actin, a central player in cell shape and movement., *Science.* 326 (2009) 1208–12. doi:10.1126/science.1175862.
- [31] P.S. Steeg, Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges., *Nat Med.* 12 (2006) 895–904. doi:10.1038/nm1469.
- [32] O. Lieleg, K.M. Schmoller, M.M.A.E. Claessens, A.R. Bausch, Cytoskeletal polymer networks: Viscoelastic properties are determined by the microscopic interaction potential of cross-links, *Biophys. J.* 96 (2009) 4725–4732. doi:10.1016/j.bpj.2009.03.038.
- [33] B. Wagner, R. Tharmann, I. Haase, M. Fischer, A.R. Bausch, Cytoskeletal polymer networks: the molecular structure of cross-linkers determines macroscopic properties., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13974–8. doi:10.1073/pnas.0510190103.
- [34] L. Blanchoin, R. Boujemaa-paterski, C. Sykes, J. Plastino, Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility, (2014) 235–263. doi:10.1152/physrev.00018.2013.
- [35] S. Ramon y Cajal, Sobre la aparicion de las expansiones celulares en la medula embrionaria, *Gac. Sanit. Barcelona.* (1890) 413–419.
- [36] T. Bornschlöggl, How filopodia pull: What we know about the mechanics and dynamics of filopodia., *Cytoskeleton (Hoboken).* 70 (2013) 590–603. doi:10.1002/cm.21130.
- [37] C. Yang, T. Svitkina, Filopodia initiation: Focus on the Arp2/3 complex and formins,

- Cell Adh. Migr. 5 (2011) 402–408. doi:10.4161/cam.5.5.16971.
- [38] L. Young, E. Heimsath, H. Higgs, Cell type dependent mechanisms for formin-mediated assembly of filopodia, *Mol. Biology Cell*. 26 (2015) 4646–4659. doi:10.1002/prot.22465.
 - [39] T.M. Svitkina, A.B. Verkhovsky, K.M. McQuade, G.G. Borisy, Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation., *J. Cell Biol.* 139 (1997) 397–415. doi:10.1083/jcb.139.2.397.
 - [40] E. Urban, S. Jacob, M. Nemethova, G.P. Resch, J.V. Small, Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia., *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 429–435. doi:10.1038/ncb2044.
 - [41] B. a. Smith, S.B. Padrick, L.K. Doolittle, K. Daugherty-Clarke, I.R. Corrêa, M.Q. Xu, B.L. Goode, M.K. Rosen, J. Gelles, Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation, *Elife*. 2013 (2013) 1–25. doi:10.7554/eLife.01008.
 - [42] E. Goley, M. Welch, The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 713–726. doi:10.1038/nrm2026.
 - [43] L. Limozin, E. Sackmann, Polymorphism of Cross-Linked Actin Networks in Giant Vesicles, *Phys. Rev. Lett.* 89 (2002) 168103. doi:10.1103/PhysRevLett.89.168103.
 - [44] L.-L. Pontani, J. van der Gucht, G. Salbreux, J. Heuvingh, J.-F. Joanny, C. Sykes, Reconstitution of an actin cortex inside a liposome., *Biophys. J.* 96 (2009) 192–8. doi:10.1016/j.bpj.2008.09.029.
 - [45] J. Lemi re, K. Guevorkian, C. Campillo, C. Sykes, T. Betz, α -Hemolysin membrane pore density measured on liposomes, *Soft Matter*. 9 (2013) 3181–3187. doi:10.1039/c3sm27812c.
 - [46] D. Marsh, Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers, *Chem. Phys. Lipids*. 144 (2006) 146–159. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.08.004.
 - [47] J.-Y. Tinevez, U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.-F. Joanny, E. Paluch, Role of cortical tension in bleb growth., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 18581–6. doi:10.1073/pnas.0903353106.
 - [48] M. Krieg, Y. Arboleda-Estudillo, P.-H. Puech, J. K fer, F. Graner, D.J. M ller, C.-P.C.-P. Heisenberg, Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish., *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 429–36. doi:10.1038/ncb1705.
 - [49] a Chaigne, C. Campillo, N.S. Gov, R. Voituriez, C. Sykes, M.H. Verlhac, M.E. Terret, A narrow window of cortical tension guides asymmetric spindle positioning in the mouse oocyte., *Nat. Commun.* 6 (2015) 6027. doi:10.1038/ncomms7027.
 - [50] E.C. Schwarz, E.M. Neuhaus, C. Kistler, a W. Henkel, T. Soldati, Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis., *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4 (2000) 621–633.
 - [51] A.D. Lieber, S. Yehudai-Resheff, E.L. Barnhart, J.A. Theriot, K. Keren, Membrane tension in rapidly moving cells is determined by cytoskeletal forces, *Curr. Biol.* 23 (2013) 1409–1417. doi:10.1016/j.cub.2013.05.063.
 - [52] E.L. Batchelder, G. Hollopeter, C. Campillo, X. Mezanges, E.M. Jorgensen, P. Nassoy, P. Sens, J. Plastino, Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 11429–11434. doi:10.1073/pnas.1010481108.
 - [53] A. Diz-Muñoz, M. Krieg, M. Bergert, I. Ibarlucea-Benitez, D.J. Muller, E. Paluch, C.P. Heisenberg, Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment, *PLoS Biol.* 8 (2010). doi:10.1371/journal.pbio.1000544.
 - [54] J. Dai, M.P. Sheetz, Membrane tether formation from blebbing cells, *Biophys. J.* 77 (1999) 3363–3370.

- [55] M.P. Sheetz, Cell control by membrane cytoskeleton adhesion, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 392–396.
- [56] F. Brochard-Wyart, N. Borghi, D. Cuvelier, P. Nassoy, Hydrodynamic narrowing of tubes extruded from cells, *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 (2006) 7660–7663.
- [57] C. Campillo, P. Sens, D. Köster, L.L. Pontani, D. Lévy, P. Bassereau, P. Nassoy, C. Sykes, Unexpected membrane dynamics unveiled by membrane nanotube extrusion, *Biophys. J.* 104 (2013) 1248–1256. doi:10.1016/j.bpj.2013.01.051.
- [58] K. Guevorkian, J. Manzi, L.-L. Pontani, F. Brochard-Wyart, C. Sykes, Mechanics of Biomimetic Liposomes Encapsulating an Actin Shell, *Biophys. J.* 109 (2015) 2471–2479. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.050.
- [59] S. Kremer, C. Campillo, B. Pépin-Donat, A. Viallat, F. Brochard-Wyart, Nanotubes from gelly vesicles, *Europhys. Lett.* 82 (2008) 48002. doi:10.1209/0295-5075/82/48002.
- [60] D.M. Andrade, M.P. Clausen, J. Keller, V. Mueller, C. Wu, J.E. Bear, S.W. Hell, B.C. Lagerholm, C. Eggeling, Cortical actin networks induce spatio-temporal confinement of phospholipids in the plasma membrane – a minimally invasive investigation by STED-FCS, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11454. doi:10.1038/srep11454.
- [61] M. Murrell, L.-L. Pontani, K. Guevorkian, D. Cuvelier, P. Nassoy, C. Sykes, Spreading dynamics of biomimetic actin cortices., *Biophys. J.* 100 (2011) 1400–9. doi:10.1016/j.bpj.2011.01.038.
- [62] M. Rao, S. Mayor, Active organization of membrane constituents in living cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 29 (2014) 126–132. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.007.
- [63] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes., *Nature.* 387 (1997) 569–72. doi:10.1038/42408.
- [64] A.P. Liu, D.A. Fletcher, Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers, *Biophys. J.* 91 (2006) 4064–4070.
- [65] W. Römer, L. Berland, V. Chambon, K. Gaus, B. Windschiegel, D. Tenza, M.R.E. Aly, V. Fraisier, J.-C. Florent, D. Perrais, C. Lamaze, G. Raposo, C. Steinem, P. Sens, P. Bassereau, L. Johannes, Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells., *Nature.* 450 (2007) 670–5. doi:10.1038/nature05996.
- [66] H.-F. Renard, M. Simunovic, J. Lemiere, E. Boucrot, M.D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A.K. Kenworthy, A.A. Schmidt, H.T. McMahon, C. Sykes, P. Bassereau, L. Johannes, Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis, *Nature.* 517 (2015) 493–496. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14064>.

Bibliographie

- [1] AAOpto-Electronics, "Microsoft Word - MT80-MT110-2014.doc - MT80-MT110-2014.pdf," 2016. [Online]. Available: <http://www.aaoptoelectronic.com/Documents/MT80-MT110-2014.pdf>. [Accessed: 01-Jun-2016].
- [2] R. S. Afzal and E. B. Treacy, "Optical tweezers using a diode laser," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 63, no. 4, p. 2157, 1992.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science, 2002.
- [4] M. Allieux-Guérin, D. Icard-Arcizet, C. Durieux, S. Hénon, F. Gallet, J.-C. Mevel, M.-J. Masse, M. Tramier, and M. Coppey-Moisan, "Spatiotemporal Analysis of Cell Response to a Rigidity Gradient: A Quantitative Study Using Multiple Optical Tweezers," *Biophys. J.*, vol. 96, no. 1, pp. 238–247, Jan. 2009.
- [5] Amar-Costesec, "Chapitre 2 - Découvertes en Cytologie et en Biologie cellulaire," 2016. [Online]. Available: <http://perso.uclouvain.be/alain.amar-costesec/chapitre-2/>. [Accessed: 23-May-2016].
- [6] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, "Liposome electroformation," *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, vol. 81, p. 303, 1986.
- [7] L. Aschenbrenner, "Uncoated Endocytic Vesicles Require the Unconventional Myosin, Myo6, for Rapid Transport through Actin Barriers," *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 5, pp. 2253–2263, Feb. 2004.
- [8] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, "Optical Levitation by Radiation Pressure," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 19, no. 8, pp. 283–285, Oct. 1971.
- [9] S. Attwood, Y. Choi, and Z. Leonenko, "Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 3514–3539, Feb. 2013.
- [10] K. Bambardekar, R. Clément, O. Blanc, C. Chardès, and P.-F. Lenne, "Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 5, pp. 1416–1421, Feb. 2015.
- [11] R. Bar-Ziv and E. Moses, "Instability and 'Pearling' States Produced in Tubular Membranes by Competition of Curvature and Tension," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 73, no. 10, pp. 1392–1395, Sep. 1994.

- [12] L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino, "Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility," *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 1, pp. 235–263, Jan. 2014.
- [13] M. Boczkowska, G. Rebowski, M. V. Petoukhov, D. B. Hayes, D. I. Svergun, and R. Dominguez, "X-Ray Scattering Study of Activated Arp2/3 Complex with Bound Actin-WCA," *Structure*, vol. 16, no. 5, pp. 695–704, May 2008.
- [14] Boulder Nonlinear Systems, "PowerPoint Presentation - XYSeriesDS0909.pdf," 2016. [Online]. Available: <http://bnonlinear.com/pdf/XYSeriesDS0909.pdf>. [Accessed: 01-Jun-2016].
- [15] W. H. Bragg and W. L. Bragg, "The Reflection of X-rays by Crystals," *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 88, no. 605, pp. 428–438, Jul. 1913.
- [16] G. J. Brouhard, H. T. Schek, and A. J. Hunt, "Advanced optical tweezers for the study of cellular and molecular biomechanics," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 50, no. 1, pp. 121–125, Jan. 2003.
- [17] A. A. M. Bui, A. B. Stilgoe, T. A. Nieminen, and H. Rubinsztein-Dunlop, "Calibration of nonspherical particles in optical tweezers using only position measurement," *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 8, p. 1244, Apr. 2013.
- [18] R. Buick, "Early life: Ancient acritarchs," *Nature*, vol. 463, no. 7283, pp. 885–886, Feb. 2010.
- [19] F. Buss, S. D. Arden, M. Lindsay, J. P. Luzio, and J. Kendrick-Jones, "Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis," *EMBO J.*, vol. 20, no. 14, pp. 3676–3684, Jul. 2001.
- [20] F. Buss, J. Kendrick-Jones, C. Lionne, A. E. Knight, G. P. Côté, and J. Paul Luzio, "The Localization of Myosin VI at the Golgi Complex and Leading Edge of Fibroblasts and Its Phosphorylation and Recruitment into Membrane Ruffles of A431 Cells after Growth Factor Stimulation," *J. Cell Biol.*, vol. 143, no. 6, pp. 1535–1545, Dec. 1998.
- [21] F. Buss, G. Spudich, and J. Kendrick-Jones, "Myosin VI: cellular functions and motor properties," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, pp. 649–676, 2004.
- [22] Bussonnier, "Actin gel mechanics," 2014.
- [23] R. Cáceres, M. Abou-Ghali, and J. Plastino, "Reconstituting the actin cytoskeleton at or near surfaces in vitro," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 11, pp. 3006–3014, Nov. 2015.
- [24] R. O. Calderón and G. H. DeVries, "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a Schwann cell line," *J. Neurosci. Res.*, vol. 49, no. 3, pp. 372–380, Aug. 1997.

- [25] C. Campillo, P. Sens, D. Köster, L.-L. Pontani, D. Lévy, P. Bassereau, P. Nassoy, and C. Sykes, "Unexpected Membrane Dynamics Unveiled by Membrane Nanotube Extrusion," *Biophys. J.*, vol. 104, no. 6, pp. 1248–1256, Mar. 2013.
- [26] P. B. Canham, "The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell," *J. Theor. Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 61–81, Jan. 1970.
- [27] M. F. Carlier, C. Jean, K. J. Rieger, M. Lenfant, and D. Pantaloni, "Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 11, pp. 5034–5038, Jun. 1993.
- [28] M.-F. Carlier, *Actin-based Motility: Cellular, Molecular and Physical Aspects*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [29] L. Carlsson, L.-E. Nyström, I. Sundkvist, F. Markey, and U. Lindberg, "Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells," *J. Mol. Biol.*, vol. 115, no. 3, pp. 465–483, Sep. 1977.
- [30] A. X. Cartagena-Rivera, J. S. Logue, C. M. Waterman, and R. S. Chadwick, "Actomyosin Cortical Mechanical Properties in Nonadherent Cells Determined by Atomic Force Microscopy," *Biophys. J.*, vol. 110, no. 11, pp. 2528–2539, Jun. 2016.
- [31] K. Carvalho, J. Lemiere, F. Faqir, J. Manzi, L. Blanchoin, J. Plastino, T. Betz, and C. Sykes, "Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, no. 1629, pp. 20130005–20130005, 2013a.
- [32] K. Carvalho, J. Lemiere, F. Faqir, J. Manzi, L. Blanchoin, J. Plastino, T. Betz, and C. Sykes, "Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, no. 1629, pp. 20130005–20130005, 2013b.
- [33] M. Cecchini, Y. Alexeev, and M. Karplus, "Pi Release from Myosin: A Simulation Analysis of Possible Pathways," *Structure*, vol. 18, no. 4, pp. 458–470, Mar. 2010.
- [34] D. P. Cherney, T. E. Bridges, and J. M. Harris, "Optical trapping of unilamellar phospholipid vesicles: investigation of the effect of optical forces on the lipid membrane shape by confocal-Raman microscopy," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 17, pp. 4920–4928, Sep. 2004.
- [35] F. D. Ciccarelli, "Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life," *Science*, vol. 311, no. 5765, pp. 1283–1287, Mar. 2006.
- [36] P. Cossart and M. Lecuit, "Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling," *EMBO J.*, vol. 17, no. 14, pp. 3797–3806, Jul. 1998.

- [37] E. M. De La Cruz, "Kinetic Mechanism and Regulation of Myosin VI," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 34, pp. 32373–32381, Aug. 2001.
- [38] U. Delabre, K. Feld, E. Crespo, G. Whyte, C. Sykes, U. Seifert, and J. Guck, "Deformation of phospholipid vesicles in an optical stretcher," *Soft Matter*, vol. 11, no. 30, pp. 6075–6088, 2015.
- [39] I. Derényi, F. Jülicher, and J. Prost, "Formation and Interaction of Membrane Tubes," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 88, no. 23, May 2002.
- [40] H.-G. Döbereiner, E. Evans, M. Kraus, U. Seifert, and M. Wortis, "Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory," *Phys. Rev. E*, vol. 55, no. 4, pp. 4458–4474, Apr. 1997.
- [41] C. G. Dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, and N. J. Nosworthy, "Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments," *Physiol. Rev.*, vol. 83, no. 2, pp. 433–473, Apr. 2003.
- [42] D. J. Estes and M. Mayer, "Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1712, no. 2, pp. 152–160, Jul. 2005.
- [43] L. Euler and A. P. Juskevici, *Correspondance de Leonhard Euler Avec A. C. Clairaut, J. D'Alembert Et J. L. Lagrange*. Springer Science & Business Media, 1980.
- [44] null Evans and null Rawicz, "Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 64, no. 17, pp. 2094–2097, Apr. 1990.
- [45] E. A. Evans, "A New Material Concept for the Red Cell Membrane," *Biophys. J.*, vol. 13, no. 9, pp. 926–940, Sep. 1973.
- [46] E. Evans, H. Bowman, A. Leung, D. Needham, and D. Tirrell, "Biomembrane templates for nanoscale conduits and networks," *Science*, vol. 273, no. 5277, pp. 933–935, Aug. 1996.
- [47] E. Evans and A. Yeung, "Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 73, no. 1–2, pp. 39–56, Sep. 1994.
- [48] J. F. Faucon, M. D. Mitov, P. Méléard, I. Bivas, and P. Bothorel, "Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements," *J. Phys.*, vol. 50, no. 17, pp. 2389–2414, 1989.
- [49] F. B. S. F.B. Straub, *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, vol. II (Szent-Gyi, A. ed.)* pp. 3-15. 1943.
- [50] E.-L. Florin, A. Pralle, E. H. K. Stelzer, and J. K. H. Hörber, "Photonic force microscope calibration by thermal noise analysis," *Appl. Phys. Mater. Sci. Process.*, vol. 66, no. 7, pp. S75–S78, Mar. 1998.

- [51] I. Fujiwara, S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. 'ichi Ishiwata, "Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 9, pp. 666–673, Sep. 2002.
- [52] M. Garten, S. Aimon, P. Bassereau, and G. E. S. Toombes, "Reconstitution of a Transmembrane Protein, the Voltage-gated Ion Channel, KvAP, into Giant Unilamellar Vesicles for Microscopy and Patch Clamp Studies," *J. Vis. Exp.*, no. 95, Jan. 2015.
- [53] F. Gittes and C. F. Schmidt, "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers," *Opt. Lett.*, vol. 23, no. 1, p. 7, Jan. 1998.
- [54] E. D. Goley and M. D. Welch, "The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 10, pp. 713–726, Oct. 2006.
- [55] E. Grazi, E. Magri, P. Cuneo, and A. Cataldi, "The control of cellular motility and the role of gelsolin," *FEBS Lett.*, vol. 295, no. 1–3, pp. 163–166, Dec. 1991.
- [56] N. M. Green, "Avidin," in *Advances in Protein Chemistry*, vol. 29, Elsevier, 1975, pp. 85–133.
- [57] J. van der Gucht, E. Paluch, J. Plastino, and C. Sykes, "Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 22, pp. 7847–7852, May 2005.
- [58] E. Hannappel, "beta-Thymosins," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1112, no. 1, pp. 21–37, May 2007.
- [59] Hatfield, "Membrane plasmique," *Wikipédia*. 2016.
- [60] C.-P. Heisenberg and Y. Bellaïche, "Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning," *Cell*, vol. 153, no. 5, pp. 948–962, May 2013.
- [61] W. Helfrich, "Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments," *Z. Für Naturforschung Teil C Biochem. Biophys. Biol. Virol.*, vol. 28, no. 11, pp. 693–703, Dec. 1973.
- [62] W. Helfrich, "Effect of thermal undulations on the rigidity of fluid membranes and interfaces," *J. Phys.*, vol. 46, no. 7, pp. 1263–1268, 1985.
- [63] W. Helfrich and R.-M. Servuss, "Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes," *Il Nuovo Cimento D*, vol. 3, no. 1, pp. 137–151, Jan. 1984.
- [64] S. Hénon, G. Lenormand, A. Richert, and F. Gallet, "A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers," *Biophys. J.*, vol. 76, no. 2, pp. 1145–1151, Feb. 1999.

- [65] T. Hodge and M. J. Cope, "A myosin family tree," *J. Cell Sci.*, vol. 113 Pt 19, pp. 3353–3354, Oct. 2000.
- [66] K. S. Horger, D. J. Estes, R. Capone, and M. Mayer, "Films of Agarose Enable Rapid Formation of Giant Liposomes in Solutions of Physiologic Ionic Strength," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 5, pp. 1810–1819, Feb. 2009.
- [67] D. Huster, A. J. Jin, K. Arnold, and K. Gawrisch, "Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by ^{17}O NMR," *Biophys. J.*, vol. 73, no. 2, pp. 855–864, Aug. 1997.
- [68] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, and B. W. Ninham, "Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers," *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, vol. 72, p. 1525, 1976.
- [69] P. A. Janmey and T. P. Stossel, "Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate," *Nature*, vol. 325, no. 6102, pp. 362–364, Jan. 1987.
- [70] M. Jarić, U. Seifert, W. Wintz, and M. Wortis, "Vesicular instabilities: The prolate-to-oblate transition and other shape instabilities of fluid bilayer membranes," *Phys. Rev. E*, vol. 52, no. 6, pp. 6623–6634, Dec. 1995.
- [71] W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes, "Atomic structure of the actin: DNase I complex," *Nature*, vol. 347, no. 6288, pp. 37–44, Sep. 1990.
- [72] M. Kaksonen, C. P. Toret, and D. G. Drubin, "A Modular Design for the Clathrin- and Actin-Mediated Endocytosis Machinery," *Cell*, vol. 123, no. 2, pp. 305–320, Oct. 2005.
- [73] M. Kaksonen, C. P. Toret, and D. G. Drubin, "Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 6, pp. 404–414, Jun. 2006.
- [74] K. Karamdad, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, and O. Ces, "Preparation and mechanical characterisation of giant unilamellar vesicles by a microfluidic method," *Lab Chip*, vol. 15, no. 2, pp. 557–562, 2015.
- [75] J. Käs and E. Sackmann, "Shape transitions and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes," *Biophys. J.*, vol. 60, no. 4, pp. 825–844, Oct. 1991.
- [76] A. Kawska, K. Carvalho, J. Manzi, R. Boujemaa-Paterski, L. Blanchoin, J.-L. Martiel, and C. Sykes, "How actin network dynamics control the onset of actin-based motility," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 36, pp. 14440–14445, Sep. 2012.
- [77] Kelvinsong, *English: A reworked version of File:Biological_cell.svg*. 2012.

- [78] S. H. Koenig, Q. F. Ahkong, R. D. Brown, M. Lafleur, M. Spiller, E. Unger, and C. Tilcock, "Permeability of liposomal membranes to water: results from the magnetic field dependence of T1 of solvent protons in suspensions of vesicles with entrapped paramagnetic ions," *Magn. Reson. Med.*, vol. 23, no. 2, pp. 275–286, Feb. 1992.
- [79] Krish, "microcosm ...," *Pinterest*, 2013. [Online]. Available: <https://www.pinterest.com/pin/20336635788365177/>. [Accessed: 25-May-2016].
- [80] Leeuwenhoek, "Let's make an Antoni van Leeuwenhoek's Microscope," 2012. [Online]. Available: http://www.funsci.com/fun3_en/antoni/vlen.htm. [Accessed: 23-May-2016].
- [81] J. Lemiere, "Cytoskeleton d'actine et déformations membranaires : du liposome à la reconstruction cellulaire," phdthesis, Université Paris Diderot, 2014.
- [82] Lipowski, *Vesicles and biomembranes*, *Encyclopedia of Applied Physics Vol. 23*. 1998.
- [83] P. Llinas, T. Isabet, L. Song, V. Ropars, B. Zong, H. Benisty, S. Sirigu, C. Morris, C. Kikuti, D. Safer, H. L. Sweeney, and A. Houdusse, "How Actin Initiates the Motor Activity of Myosin," *Dev. Cell*, vol. 33, no. 4, pp. 401–412, May 2015.
- [84] R. W. Lymn and E. W. Taylor, "Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 10, no. 25, pp. 4617–4624, Dec. 1971.
- [85] J.-B. Manneville, P. Bassereau, S. Ramaswamy, and J. Prost, "Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration," *Phys. Rev. E*, vol. 64, no. 2, Jul. 2001.
- [86] Meadowlark Optics, "XY Spatial Light Modulator | Meadowlark Optics," 2016. [Online]. Available: <http://www.meadowlark.com/xy-spatial-light-modulator-p-119#.V08Mrdf1Hj4>. [Accessed: 01-Jun-2016].
- [87] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson, "Membrane lipids: where they are and how they behave," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 112–124, Feb. 2008.
- [88] P. Méléard, C. Gerbeaud, P. Bardusco, N. Jeandaine, M. D. Mitov, and L. Fernandez-Puente, "Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles," *Biochimie*, vol. 80, no. 5–6, pp. 401–413, May 1998.
- [89] L. Miao, U. Seifert, M. Wortis, and H.-G. Döbereiner, "Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity," *Phys. Rev. E*, vol. 49, no. 6, pp. 5389–5407, Jun. 1994.

- [90] A. L. Miller, "The contractile ring," *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 24, pp. R976–R978, Dec. 2011.
- [91] K. G. Miller, "Actin-binding proteins from *Drosophila* embryos: a complex network of interacting proteins detected by F-actin affinity chromatography," *J. Cell Biol.*, vol. 109, no. 6, pp. 2963–2975, Dec. 1989.
- [92] S. Miserey-Lenkei, G. Chalancon, S. Bardin, E. Formstecher, B. Goud, and A. Echard, "Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 7, pp. 645–654, Jul. 2010.
- [93] N. Morone, T. Fujiwara, K. Murase, R. S. Kasai, H. Ike, S. Yuasa, J. Usukura, and A. Kusumi, "Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography," *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 6, pp. 851–862, Sep. 2006.
- [94] M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, N. Matsuzaki, T. Azuma, K. Sekine, H. Endo, and T. Handa, "Flip-Flop of Phospholipids in Vesicles: Kinetic Analysis with Time-Resolved Small-Angle Neutron Scattering," *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 19, pp. 6745–6748, May 2009.
- [95] P. Nassoy, D. Cuvelier, R. Bruinsma, and F. Brochard-Wyart, "Nanofluidics in cellular tubes under oscillatory extension," *EPL Europhys. Lett.*, vol. 84, no. 1, p. 18004, Oct. 2008.
- [96] K. C. Neuman and S. M. Block, "Optical trapping," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 75, no. 9, p. 2787, 2004.
- [97] Oda and Iwasa, "The nature of the globular - to fibrous-actin transition," 2009.
- [98] S. Ohki, "Dielectric constant and refractive index of lipid bilayers," *J. Theor. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 97–115, Apr. 1968.
- [99] R. Pankov, T. Markovska, P. Antonov, L. Ivanova, and A. Momchilova, "The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 164, no. 3, pp. 167–173, Dec. 2006.
- [100] S. Pautot, B. J. Frisken, and D. A. Weitz, "Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion," *Langmuir*, vol. 19, no. 7, pp. 2870–2879, Apr. 2003.
- [101] E. J. G. Peterman, F. Gittes, and C. F. Schmidt, "Laser-Induced Heating in Optical Traps," *Biophys. J.*, vol. 84, no. 2, pp. 1308–1316, Feb. 2003.
- [102] H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, "Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 95, no. 1, pp. 83–94, Sep. 1998.

- [103] J. Plastino and C. Sykes, "The actin slingshot," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 62–66, Feb. 2005.
- [104] Pollard, "Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments," *J. Cell Biol.*, vol. 103, no. 6, pp. 2747–2754, Dec. 1986.
- [105] T. D. Pollard, L. Blanchoin, and R. D. Mullins, "Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 29, no. 1, p. 545, Jun. 2000.
- [106] T. D. Pollard and G. G. Borisy, "Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments," *Cell*, vol. 112, no. 4, pp. 453–465, Feb. 2003.
- [107] A. Pralle, M. Prummer, E. L. Florin, E. H. Stelzer, and J. K. Hörber, "Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 44, no. 5, pp. 378–386, Mar. 1999.
- [108] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. Evans, "Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 1, pp. 328–339, Jul. 2000.
- [109] H.-F. Renard, M. Simunovic, J. Lemi re, E. Boucrot, M. D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A. K. Kenworthy, A. A. Schmidt, H. T. McMahon, C. Sykes, P. Bassereau, and L. Johannes, "Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis," *Nature*, vol. 517, no. 7535, pp. 493–496, Dec. 2014.
- [110] A. C. Richardson, S. N. S. Reihani, and L. B. Oddershede, "Non-harmonic potential of a single beam optical trap," *Opt. Express*, vol. 16, no. 20, p. 15709, Sep. 2008.
- [111] Robert Hooke, *The cork described in "Micrographia" by Robert Hooke*. 2006.
- [112] M. S. Rocha, "Optical tweezers for undergraduates: Theoretical analysis and experiments," *Am. J. Phys.*, vol. 77, no. 8, p. 704, 2009.
- [113] Rosen, *BRITANNICA GUIDE TO THEORIES AND IDEAS*. 2009.
- [114] O. Rossier, D. Cuvelier, N. Borghi, P. H. Puech, I. Derényi, A. Buguin, P. Nassoy, and F. Brochard-Wyart, "Giant Vesicles under Flows: Extrusion and Retraction of Tubes," *Langmuir*, vol. 19, no. 3, pp. 575–584, Feb. 2003.
- [115] I. Rouiller, X.-P. Xu, K. J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T. D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein, "The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex," *J. Cell Biol.*, vol. 180, no. 5, pp. 887–895, Mar. 2008.

- [116] A. Roux, *Tubes de membrane dans le trafic intracellulaire : aspects physiques et biologiques*. Paris 7, 2004.
- [117] A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Prost, P. Bassereau, and B. Goud, "Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules," *EMBO J.*, vol. 24, no. 8, pp. 1537–1545, Apr. 2005.
- [118] P. G. Saffman and M. Delbrück, "Brownian motion in biological membranes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 72, no. 8, pp. 3111–3113, Aug. 1975.
- [119] G. Salbreux, G. Charras, and E. Paluch, "Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis," *Trends Cell Biol.*, vol. 22, no. 10, pp. 536–545, Oct. 2012.
- [120] D. A. Schafer, P. B. Jennings, and J. A. Cooper, "Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides," *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 1, pp. 169–179, Oct. 1996.
- [121] I. Semova, J. D. Carten, J. Stombaugh, L. C. Mackey, R. Knight, S. A. Farber, and J. F. Rawls, "Microbiota Regulate Intestinal Absorption and Metabolism of Fatty Acids in the Zebrafish," *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 3, pp. 277–288, Sep. 2012.
- [122] J. Senior and G. Gregoriadis, "Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: The effect of the phospholipid and cholesterol components," *Life Sci.*, vol. 30, no. 24, pp. 2123–2136, Jun. 1982.
- [123] Y.-L. Shih, K.-F. Huang, H.-M. Lai, J.-H. Liao, C.-S. Lee, C.-M. Chang, H.-M. Mak, C.-W. Hsieh, and C.-C. Lin, "The N-Terminal Amphipathic Helix of the Topological Specificity Factor MinE Is Associated with Shaping Membrane Curvature," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6, p. e21425, Jun. 2011.
- [124] T. Simpson, *Trigonometry, Plane and Spherical: With the Construction and Application of Logarithms*. J. Nourse, 1799.
- [125] Splettstoesser, "Actine," *Wikipédia*. 2006.
- [126] J. A. Spudich, S. E. Rice, R. S. Rock, T. J. Purcell, and H. M. Warrick, "Optical Traps to Study Properties of Molecular Motors," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2011, no. 11, p. pdb.top066662-top066662, Nov. 2011.
- [127] Szent-Györgyi, "Prof. Szent-Györgyi," *Nature*, vol. 155, no. 3947, pp. 750–750, Jun. 1945.
- [128] J. A. Theriot, J. Rosenblatt, D. A. Portnoy, P. J. Goldschmidt-Clermont, and T. J. Mitchison, "Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts," *Cell*, vol. 76, no. 3, pp. 505–517, Feb. 1994.
- [129] M. Théry and M. Bornens, "Get round and stiff for mitosis," *HFSP J.*, vol. 2, no. 2, pp. 65–71, Apr. 2008.

- [130] M. Thery, V. Racine, M. Piel, A. Pepin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.-B. Sibarita, and M. Bornens, "Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 52, pp. 19771–19776, Dec. 2006.
- [131] Thorlabs, "Thorlabs - GVS011 1D Large Beam (10 mm) Diameter Galvo System, Silver-Coated Mirror, PSU Not Included," 2010. [Online]. Available: <http://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=GVS011>. [Accessed: 01-Jun-2016].
- [132] L. G. Tilney and D. A. Portnoy, "Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*," *J. Cell Biol.*, vol. 109, no. 4, pp. 1597–1608, Oct. 1989.
- [133] S. F. Tolić-Nørrelykke, E. Schäffer, J. Howard, F. S. Pavone, F. Jülicher, and H. Flyvbjerg, "Calibration of optical tweezers with positional detection in the back focal plane," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 77, no. 10, p. 103101, 2006.
- [134] H. Turlier, D. A. Fedosov, B. Audoly, T. Auth, N. S. Gov, C. Sykes, J.-F. Joanny, G. Gompper, and T. Betz, "Equilibrium physics breakdown reveals the active nature of red blood cell flickering," *Nat. Phys.*, vol. 12, no. 5, pp. 513–519, Jan. 2016.
- [135] L. Vidali and P. K. Hepler, "Actin and pollen tube growth," *Protoplasma*, vol. 215, no. 1–4, pp. 64–76, 2001.
- [136] K. Visscher, S. P. Gross, and S. M. Block, "Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 2, no. 4, pp. 1066–1076, Dec. 1996.
- [137] R. E. Waugh, "Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. I. Analysis," *Biophys. J.*, vol. 38, no. 1, pp. 19–27, Apr. 1982.
- [138] A. Weinberger, F.-C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, and C. Marques, "Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles," *Biophys. J.*, vol. 105, no. 1, pp. 154–164, Jul. 2013.
- [139] A. L. Wells, A. W. Lin, L.-Q. Chen, D. Safer, S. M. Cain, T. Hasson, B. O. Carragher, R. A. Milligan, and H. L. Sweeney, "Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards," *Nature*, vol. 401, no. 6752, pp. 505–508, Sep. 1999.
- [140] O. Wesołowska, K. Michalak, J. Maniewska, and A. B. Hendrich, "Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 56, no. 1, pp. 33–39, 2009.
- [141] S.-H. Wu, S. Sankhagowit, R. Biswas, S. Wu, M. L. Povinelli, and N. Malmstadt, "Viscoelastic deformation of lipid bilayer vesicles," *Soft Matter*, vol. 11, no. 37, pp. 7385–7391, 2015.

- [142] M. Yanagisawa, M. Imai, and T. Taniguchi, "Shape Deformation of Ternary Vesicles Coupled with Phase Separation," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 14, Apr. 2008.
- [143] M. S. Yousafzai, F. Ndoye, G. Coceano, J. Niemela, S. Bonin, G. Scoles, and D. Cojoc, "Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation," *Opt. Lasers Eng.*, vol. 76, pp. 27–33, Jan. 2016.
- [144] E. Zinser, C. D. Sperka-Gottlieb, E. V. Fasch, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, and G. Daum, "Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Bacteriol.*, vol. 173, no. 6, pp. 2026–2034, Mar. 1991.

Résumé

Le transport intracellulaire met en jeu des vésicules, et nécessite ainsi des modifications de la membrane plasmique. En particulier, des nano-tubes de membrane de quelque dizaine de nanomètres peuvent se former.

Nous avons mis en place un système biomimétique à base de liposome pour décrypter les mécanismes de changement de forme membranaire, en particulier sous l'action du cytosquelette d'actine. La physique des tubes de membrane est bien connue, notamment la force nécessaire au maintien de ce type de tube, qui dépend de l'élasticité de courbure du liposome et de sa tension de membrane imposée par l'aspiration d'une micropipette. En utilisant une diode quatre quadrants, nous avons atteint une résolution temporelle de l'ordre de 4 μ s, et une résolution en terme de force plus précise que le pN. Ce montage permet pour la première fois d'étudier les fluctuations de tels tubes.

Cette thèse ouvre la voie à l'étude des effets de la polymérisation d'actine sur ces nano-tubes.

Abstract

Intracellular transport involves membrane compartments and thus requires dynamic changes in the morphology of cell membranes. In this case, membrane tubes are formed whose radius is of the order of several tens of nanometers.

We develop biomimetic systems based on model lipid membranes to decipher the mechanisms of membrane remodelling in particular under the action of the actin cytoskeleton. The mechanics of membrane nanotubes, especially the force needed to form and maintain a nanotube, are now well understood. The force depends on the curvature elasticity of the membrane and on its mechanical tension that is controlled in our experiment by micropipette aspiration. By using a four-quadrants diode, we obtain an unprecedented temporal resolution, in the order of 4 μ s, and a force resolution under pN. This setup allows us to access unrivaled membrane nanotube properties.

This thesis paves the way for studying the effect of actin dynamics on membrane nanotubes.