

# Etude du rôle des protéines partenaires de l'actine dans la mécanique des gels branchés de levure

Jessica Planade

# ► To cite this version:

Jessica Planade. Etude du rôle des protéines partenaires de l'actine dans la mécanique des gels branchés de levure. Physique [physics]. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT: 2016USPCC285. tel-01923936

# HAL Id: tel-01923936 https://theses.hal.science/tel-01923936

Submitted on 15 Nov 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.





# Thèse de doctorat de L'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

ÉCOLE DOCTORALE Physique en Île-de-France (E.D. 564) Laboratoire Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes de l'ESPCI Paris (UMR 7636 CNRS/ESPCI/Paris 6/Paris 7)

# Étude du rôle des protéines partenaires de l'actine dans la mécanique des gels branchés de levure

Par Jessica PLANADE

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par Olivia du Roure et Julien Heuvingh

Présentée et soutenue publiquement à l'ESPCI Paris le vendredi 16 décembre 2016

Présidente du jury :	Sylvie HÉNON, Professeure, UPD
Rapporteurs :	Christophe LE CLAINCHE, Chargé de Recherche, I2BC
	Gladys MASSIERA, Maître de Conférences, Université Montpellier II
Examinateurs :	Jean BAUDRY, Directeur de Rechcerche, ESPCI Paris
	Cécile Sykes, Directrice de Recherche, Institut Curie
Directrice de thèse :	Olivia DU ROURE, Chargée de Recherche, ESPCI Paris
Membres invités :	Julien HEUVINGH (Co-encadrant de thèse), Maître de Conférences, UPL
	Alphée MICHELOT, Chargé de Recherche, IBDM

This work is licensed under https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/



# Apperçu de la thèse et introduction du plan

La cellule est considérée comme l'unité du vivant. Elle est constituée du matériel génétique nécessaire à la production de ses outils (protéines et ARN) et à sa reproduction, de compartiments appelés organites assurant différentes fonctions (mitochondrie pour la respiration, appareil de Golgi pour la maturation des protéines, etc.), d'un squelette polymère et d'une membrane lipidique contenant l'ensemble.

Qu'il s'agisse de cellules dites procaryotes - sans noyau - dont l'ADN flotte librement dans le cytoplasme, ou de cellules eucaryotes - chez qui l'ADN est enfermé dans le noyau -, toutes sont organisées par leur cytosquelette à qui elles doivent leur forme et leur intégrité mécanique. Ce squelette est composé de polymères (actine, microtubules et filaments intermédiaires) et il est très dynamique, capable notamment de s'adapter pour accommoder les contraintes, développer ou transmettre des forces. D'innombrables processus font appel à ces propriétés dès le stade de l'embryogénèse. On peut citer la division cellulaire, la migration cellulaire individuelle ou en tant qu'ensemble cellulaire d'un tissu, ou encore la nécessité de se déformer pour traverser des espaces étroits, comme par exemple un lymphocyte T se faufilant entre les cellules des parois des vaisseaux sanguins pour rejoindre une zone infectée des tissus.

L'actine est le composant du cytosquelette qui est principalement responsable de la rigidité et de la structure externe des cellules [Charras et Horton, 2003]. Ce polymère se présente dans la cellule sous différentes formes de réseaux, différenciés par leur architecture (longueur des filaments, agencement les uns par rapport aux autres, . . .). Ce sont des protéines partenaires de l'actine (ABPs) qui façonnent ces réseaux. Arp2/3 est un complexe protéique à l'origine des réseaux branchés que l'on retrouve sur les sites d'endocytose et à l'avant des cellules en migration par reptation. Nous nous intéressons aux propriétés mécaniques des gels d'actine branchés, en lien avec leur composition biochimique. L'approche expérimentale choisie pour cette thèse est basée sur la combinaison de deux méthodes développées par Olivia du Roure, Julien Heuvingh et Thomas Pujol d'une part pour la quantification des propriétés mécaniques, et par Alphée Michelot et Audrey Guillotin d'autre part pour les aspects biochimiques.

Il est possible de reconstituer *in vitro* des gels d'actine branchés à partir d'un mélange de protéines purifiées ou bien à partir d'extrait cellulaire. La technique classique consiste à utiliser une machinerie biochimique dite "machinerie Arp2/3" pour assembler un gel d'actine dont la structure est proche de celles des structures cellulaires. Le complexe Arp2/3, une fois activé, permet de générer de nouvelles branches et ainsi d'assurer la polymérisation d'un réseau. Une intense activité de recherche autour des années 1999-2000 a montré qu'il suffit de greffer des billes avec l'activateur d'Arp2/3 et de les mettre en présence de quelques protéines (actine, Arp2/3 et protéines de coiffe qui bloquent la croissance des filaments, au minimum) ou d'un extrait cellulaire ([Loisel et al., 1999]; [Cameron et al., 1999]; [Bernheim-Groswasser et al., 2002]) pour générer le polymérisation d'un gel d'actine dense et branché. La machinerie Arp2/3 est très conservée dans l'évolution et se retrouve chez la majorité des eucaryotes. Chez la levure,

les réseaux branchés sont présents uniquement au niveau des sites d'endocytose. Il a été montré que la protéine Las17 (un activateur de Arp2/3 chez la levure) suffit à initier la croissance de ces réseaux dans un extrait cellulaire de levure [Michelot et al., 2010]. L'adsorption de Las17 purifiée à la surface de billes colloïdales nous permet de faire pousser les réseaux tout autour des billes. Ces réseaux obtenus *in vitro* comptent environ 90 protéines différentes.

Nous utilisons des colloïdes magnétiques pour tester les propriétés mécaniques des gels qui les entourent car il est possible de générer et de contrôler une force entre eux, ce qui nous permet d'appliquer des sollicitations de différentes formes sur les gels tout en enregistrant la réponse par microscopie optique. Plus précisément, la technique de mesure des propriétés mécaniques de gels de polymères à l'aide de billes superparamagnétiques repose sur l'apparition de forces dipolaires entre les billes lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique. Ces forces causent l'auto-organisation des billes en longues chaînes au sein desquelles chaque bille est attirée par ses voisines. Cette technique permet de tester la mécanique de n'importe quel gel présent autour des billes. La mesure donne accès à des courbes force-distance dont on extrait les paramètres mécaniques du gel. En particulier, l'utilisation d'une rampe de force (typiquement entre quelques pN et 1,5 nN et réalisée en 15 secondes) donne accès à deux paramètres caractéristiques utilisés principalement dans cette thèse, le module élastique et une mesure de la plasticité des réseaux. La qualité de la mesure repose sur la connaissance très précise de la force exercée grâce à un bon contrôle du champ magnétique généré et à l'homogénéité de la quantité de domaines magnétiques dans les billes. La mesure très précise de l'indentation des gels au cours de l'expérience est également nécessaire, et est réalisée grâce à la mesure de la position du centre des billes avec une précision de quelques nanomètres combinée à une très faible polydispersité des billes. Connaissant leur rayon et leur position, l'épaisseur des gels les entourant est connue à tout moment avec une grande précision. Cette mesure indirecte de l'épaisseur permet de travailler avec des réseaux très fins, contrairement aux techniques d'imagerie directe en fluorescence utilisées couramment en biologie.

L'utilisation de cette technique requiert donc la combinaison d'un système de génération du champ magnétique nécessaire à l'auto-organisation des billes, d'un microscope à fort grossissement, et d'une caméra rapide pour garder une bonne fréquence d'acquisition dans le cas de sollicitations mécaniques à haute fréquence, le tout contrôlé par un ordinateur.

L'extraction des paramètres mécaniques des courbes force-distances obtenues nécessite l'utilisation d'un modèle de Hertz pour les contacts sphériques auquel est incorporée une correction proposée par Dimitriadis [Dimitriadis et al., 2002] pour les matériaux d'épaisseur finie.

Enfin, il faut noter que cette technique de mesure à l'aide de billes magnétiques est à haut débit, qualité appréciable pour l'étude des systèmes biologiques qui sont connus pour la dispersion des mesures qu'ils génèrent. La possibilité de mesurer les propriétés d'un grand nombre de gels nous permet également de tester beaucoup de conditions biochimiques différentes afin de les comparer. Le choix de la levure, organisme facile à utiliser pour les manipulations génétiques, donne accès à un vaste panel de mutants pour différentes protéines partenaires de l'actine dont l'architecture des réseaux branchés varie par rapport au type sauvage. Nous travaillons donc d'une part sur des réseaux générés à partir d'extraits cellulaires, et d'autre part à partir de mélanges d'un nombre minimum de protéines de levure purifiées. Cela nous permet de comparer la mécanique des réseaux « complets » issus des extraits cellulaires entre eux et avec les réseaux « simplifiés » afin de rassembler le maximum d'informations possible sur le rôle spécifique sur la mécanique des gels de chaque protéine partenaire de l'actine étudiée.

Les réseaux croissent autour des billes avec des caractéristiques (dynamique, épaisseur maximale atteinte) qui permettent d'ores et déjà d'établir une distinction entre les différents types d'extraits et de mélanges de protéines purifiées.

Les mesures mécaniques avec rampes de force font, elles, apparaître une rigidité importante des gels obtenus à partir d'extraits de levure (modules d'Young de plusieurs kPa). Les courbes force-indentation présentent par ailleurs une hystérèse qui nous renseigne sur l'existence d'une fragilité de ces gels d'actine branchés ou d'une dynamique d'interaction rapide de certaines de protéines partenaires de l'actine. C'est un phénomène qui avait été encore peu observé lors de précédents travaux sur les réseaux branchés d'actine.

La levure bourgeonnante compte cinq types de protéines différentes ayant de potentielles fonctions de réticulation. Le cœur de ce travaille de thèse consiste en l'étude de trois d'entre elles, les plus pertinentes pour les réseaux branchés : Sac6, Scp1 et Abp140. Deux résultats principaux ressortent de cette étude : d'une part l'élasticité des réseaux issus d'extraits mutés pour l'une ou plusieurs des protéines de réticulation ne varie qu'en l'absence d'une protéine, Sac6. Ce résultat suggère que Sac6 joue un rôle prédominant dans l'élasticité des réseaux d'actine branché mais pas Scp1 ni Abp140. L'évolution de la réponse élastique des gels de protéines purifiées ou de mutants  $sac6\Delta$  (issus de cellules n'exprimant pas sac6) lorsque Sac6 est ajouté à la solution confirme le rôle de cette protéine sur l'élasticité. D'autre part l'analyse de l'hystérèse révèle, elle, un rôle important de Scp1. La variation de la pente de sollicitation des rampes de force met en évidence une forte dépendance de la réponse en fréquence et permet de confirmer l'existence d'une dynamique d'interaction avec l'actine différente pour Scp1.

Par ailleurs, la mesure de l'hystérèse est également affectée par l'absence de Abp140. Enfin, l'ajout de Sac6 dans le système de protéines purifiées augmente l'hystérèse, de même que son absence dans les mutants  $sac6\Delta$ . Cet effet contradictoire n'est pas encore expliqué mais montre que les mutants  $sac6\Delta$  ne sont pas simplement des « types sauvages » dont on a enlevé la protéine Sac6.

L'ensemble de ces mesures confirme une collaboration étroite des différentes protéines de réticulation, avec des rôles différents de chacune d'entre elles dans la mécanique des réseaux, et pose des questions sur les possibles concurrences pour la liaison à l'actine entre ces protéines. Ces résultats montrent également, d'un point de vue du protocole expérimental, que des tests mécaniques multiples sont nécessaires pour discriminer le rôle des protéines d'une même famille de protéines de liaison à l'actine. Ces mesures confirment aussi la nécessité de combiner les approches pour étudier des systèmes complexes tels que les réseaux d'actine branchés de levure et confortent le choix d'une technique de mesure haut débit.

Au cours de cette thèse nous avons également réalisé quelques mesures préliminaires (soit par leur faible puissance statistique, soit par le nombre restreint de conditions testées) sur des représentants des autres grandes familles de protéines de liaisons à l'actine impliquées dans la machinerie Arp2/3. Nous avons réalisé une série de mesure de l'élasticité et de l'hystérèse sur le système de protéines purifiées, pour différentes concentrations d'actine, d'Arp2/3 et de CP (protéine de coiffe de la levure). Nous nous sommes ensuite penché plus avant sur le rôle d'Arp2/3de levure dans la faible rigidité des réseaux branchés obtenus à partir d'un mélange de quatre protéines en comparant son rôle sur l'élasticité et la plasticité à celui de la protéine Arp2/3mammifère. Il apparaît que Arp2/3 de levure produit des réseaux d'actine beaucoup moins rigides que Arp2/3 de mammifère dans le cas de l'actine mammifère. Ceci souligne l'existence de variations significatives de propriétés des ABPs et de l'actine elle-même entre espèces, malgré le grand nombre d'homologues dénombrés. Les résultats obtenus sur la CP sont eux comparés aux mesures réalisées sur un mutant  $cap 2\Delta$  (qui n'exprime pas la protéine Cap2). Des mesures ont également été réalisées sur le mutant  $aip1\Delta$  (Aip1 est une protéine agissant sur la dépolymérisation de l'actine). La diminution de la capacité des réseaux à se renouveler entraine une baisse de leur rigidité. Enfin nous comparons les résultats des sollicitations en fréquence sur un mutant pour chaque grande famille : l'extrait de type sauvage, le mutant  $sac6\Delta scp1\Delta$ , le mutant  $aip1\Delta$ . Ces mesures semblent pointer vers une influence des protéines de réticulation, et sans doute de leur dynamique de détachement, sur la réponse des réseaux à basse fréquence de sollicitation.

Je décris ci-après les différents chapitres de cette thèse. Dans le premier chapitre de ce manuscrit nous présentons une introduction générale du squelette cellulaire et de son rôle dans les interactions physiques permanentes de la cellule avec son environnement. Nous décrivons les composants du cytosquelette en détaillant le cas de l'actine : nous évoquons les conditions biochimiques de croissance des filaments, puis nous nous intéressons à la caractérisation mécanique de l'actine, à l'échelle des filaments tout d'abord, et à l'échelle des réseaux ensuite. Le dernier paragraphe sera l'occasion de faire un tour d'horizon des études réalisées à ce jour sur les réseaux branchés d'actine, sur lesquels nous avons travaillé dans cette thèse.

Un second chapitre nous permet de décrire le système biologique en jeu, la levure bourgeonnante, ainsi que les principes physiques sous-jacents à la technique expérimentale de mesure des propriétés mécaniques que nous utilisons au laboratoire.

Dans le chapitre suivant sont présentées les caractéristiques techniques du montage expérimental ainsi que les protocoles opératoires. Des techniques d'imagerie en molécule unique et de microfabrication qui ont été ponctuellement utilisées ou développées pendant cette thèse sont, elles, présentées en Annexes.

Dans le quatrième chapitre nous présentons les caractéristiques des réseaux branchés obtenus autour des billes à partir d'extraits cellulaires de levure. Tout d'abord nous regardons les caractéristiques propres des gels non sollicités mécaniquement. Puis, à l'aide des différents tests en compression auquel notre système de mesure nous donne accès, nous étudions les réponses caractéristiques de notre système à différentes sollicitations en mettant l'accent sur la réponse de l'extrait cellulaire de type sauvage.

Le chapitre cinq présente tous les résultats obtenus sur les protéines de réticulation puis les discute en regard des informations présentes dans la littérature.

Le chapitre suivant est l'occasion d'élargir l'étude par la présentation des mesures préliminaires sur d'autres grandes familles d'ABPs des réseaux branchés.

Enfin, un dernier chapitre nous permet de conclure sur l'ensemble des résultats et de discuter la pertinence de quelques expériences complémentaires en imagerie ainsi qu'une évolution du setup expérimental pour la suite du projet.

# Table des matières

1	Mée	lécanique cellulaire et cytosquelette d'actine		11
	1.1	1 Introduction : les cellules sentent et produisent des	forces	11
	1.2	2 Le Cytosquelette		12
		1.2.1 Actine : structures et partenaires		13
		$1.2.2$ Microtubules $\ldots$		15
		1.2.3 Filaments intermédiaires		15
	1.3	3 Construction des filaments d'actine		16
		1.3.1 De la protéine globulaire au filament		16
		1.3.2 Paramètres chimiques de croissance des fila	ments	16
		1.3.3 Des Filaments semi-flexibles		17
	1.4	4 Mesures mécaniques sur gels d'actine reconstitués i	n vitro $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	17
		1.4.1 Réseaux d'actine en solution		18
		1.4.2 Réseaux denses polymérisés depuis une surf	ace	19
<b>2</b>	Enj	njeux de cette étude et démarche expérimental	e	23
	2.1	1 La levure bourgeonnante : un organisme modèle .		24
		2.1.1 Les structures d'actine		24
		2.1.2 Réseaux d'actine branchés : les sites d'endo	cytose	24
	2.2	2 Reconstitution des réseaux d'actine des patchs end	ocytiques in vitro	26
		2.2.1 Croissance sur billes colloïdales fonctionalis	ées	26
		2.2.2 Les comètes d'actine		27
	2.3	3 Partenaires de l'actine dans les réseaux branchés et	machinerie $Arp2/3$	27
		2.3.1 Protéines partenaires de l'actine dans les ré	seaux branchés	27
		2.3.2 La machinerie $Arp2/3$		30
	2.4	4 Deux approches expérimentales		31
		2.4.1 Les Manipulations génétiques : Approche "	Fop-Down"	31
		2.4.2 Purification de protéines : "Approche Botto	m-Up"	31
	2.5	5 Des colloïdes magnétiques pour mesurer la mécanic	que des gels d'actine	31
		2.5.1 Matérieux magnétiques et superparamagnét	isme	31
		2.5.2 Principe et avantages de la mesure		32
	2.6	6 Bilan		33
		2.6.1 Choix des protéines étudiées		33
		2.6.2 Conclusion		34
3	Mat	latériel et Méthodes		37
	3.1	1 Méthode des billes magnétiques		37
		3.1.1 Setup experimental		37
		3.1.2 Analyse		43
	3.2	2 Préparation des échantillons biologiques		50
		3.2.1 Extraits cellulaires		50
		3.2.2 Les protéines purifiées		51

		3.2.3 Reconstitution in vitro
4	Pro	priétés mécaniques des gels d'actine reconstitués 57
	4.1	Croissance des gels
	4.2	Mécanique des réseaux assemblés à partir des extraits
		4.2.1 Mesure du module d'Young et mise en évidence d'une plasticité 62
		4.2.2 Quantification du module d'Young et de la plasticité
		4.2.3 Dépendance de l'élasticité avec le temps de polymérisation 65
		4.2.5 Dependance de l'élastiche avec le temps de polymensation $\dots \dots \dots$
		4.2.4 Repetition des sometations $\dots \dots \dots$
		4.2.5 Influence de la force maximale appliquee sur l'hysterese
		4.2.6 Insensibilité de l'hystèrése à la rigidité du gel
		4.2.7 Dépendance du module à la vitesse de sollicitation
	4.3	Des réponses très différentes dans le cas du système "minimal" 71
	4.4	Conclusion
<b>5</b>	$\mathbf{E}\mathbf{t}_{1}$	ude de l'influence des protéines de réticulation 75
	5.1	Variations de l'élasticité et de la plasticité en fonction de la protéine de réticulation 75
		5.1.1 module d'Young
		5.1.2 Hystérèse 77
	59	Influence de la vitesse de sollicitation
	5.2	Validation dans la système purifié : ajout de Sach
	0.0	validation dans le système purme : ajout de Saco
		5.3.1 Module d'Young 81
		5.3.2 Hystérése
	5.4	Supplémentation en Sac6 des mutants 83
	5.5	Résumé des résultats
	5.6	Discussion
6	Etu	des des autres grandes familles : résultats préliminaires 91
	6.1	Effet de l' $Arp2/3$ et des protéines de coiffes $\dots \dots \dots$
		6.1.1 Système de protéines purifiées de la levure
		6.1.2 Arp $2/3$ de levure : effet sur réseaux d'actine de levure et de mammifère . 93
		61.3 Extraits mutants où CP manque
	62	Protéines de désessemblage : Ain1 et coffline
	6.2	Sinusoïdos : companyison entre sutreita mutenta de chaque grande famille de par
	0.5	tenaires de l'actine
-	C	
1	Cor	iclusion et perspectives 99
	7.1	Tests sur colloïdes "plats"
	7.2	Dynamique du réseau
8	Anı	nexes 113
	8.1	Microfabrication de colloïdes plats
		8.1.1 Fabrication d'un wafer : photolitographie
		8.1.2 Réalisation d'un moule en PDMS
		8.1.3 Fabrication des colloïdes : nouvel agent réticulant
		814 Extraction des colloïdes
	00	Companyigon des avitànes de sélection du fit sur record de section
	0.2	Comparation des criteres de selection du il sur rampe de compression $\dots \dots \dots$
		8.2.1 Anciens criteres : deil et dei2
		8.2.2 Effet sur les distributions des mesures
	8.3	Caractérisation des gels reconstitués à partir d'extraits cellulaires de levure :
		<b>5.3.1</b> One mutation non liee a la structure des gels n'affecte pas la mecanique . 119

8.3.2	Fluage .			•	•	•	•	•	•	•	•				•	•		•	•		•					•	•	•		•	•						•	•	•	•	1	19	)
-------	----------	--	--	---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	---	---	--	---	---	--	---	--	--	--	--	---	---	---	--	---	---	--	--	--	--	--	---	---	---	---	---	----	---

# Chapitre 1

# Mécanique cellulaire et cytosquelette d'actine

DANS ce premier chapitre nous allons présenter une introduction générale du squelette cellulaire et de son rôle dans les interactions physiques permanentes de la cellule avec son environnement. Nous décrirons les composants du cytosquelette en détaillant le cas de l'actine : nous évoquerons les conditions biochimiques de croissance des filaments, puis nous nous intéresserons à la caractérisation mécanique de l'actine, à l'échelle des filaments tout d'abord rapidement, et à l'échelle des réseaux ensuite.

L'actine est le composant du cytosquelette qui est principalement responsable de la rigidité et de la structure externe des cellules ([Charras et Horton, Biophys. J. 2002]). Ce polymère se présente dans la cellule sous différentes formes de réseaux, différenciés par leur architecture (longueur des filaments, agencement les uns par rapport aux autres, ...). Ce sont des protéines partenaires de l'actine qui façonnent ces réseaux. Arp2/3 est un complexe protéique à l'origine des réseaux branchés que l'on retrouve sur les sites d'endocytose et à l'avant des cellules en migration par reptation. Le dernier paragraphe sera l'occasion de faire un tour d'horizon des études réalisées à ce jour sur les réseaux branchés d'actine, sur lesquels nous avons travaillé dans cette thèse.

# 1.1 Introduction : les cellules sentent et produisent des forces

La cellule est considérée comme l'unité du vivant. Elle est constituée du matériel génétique nécessaire à la production de ses outils (protéines et ARN) et à sa reproduction, de compartiments appelés organites assurant différentes fonctions (mitochondrie pour la respiration, appareil de Golgi pour la maturation des protéines, etc.), d'un squelette polymère et d'une membrane lipidique contenant l'ensemble.

Qu'il s'agisse de cellules dite procaryotes - sans noyau - dont l'ADN flotte librement dans le cytoplasme, ou de cellules eucaryotes - chez qui l'ADN est enfermé dans le noyau -, toutes sont organisées par leur cytosquelette à qui elles doivent leur forme et leur intégrité mécanique. Ce squelette est composé de polymères (actine, microtubules et filaments intermédiaires) et il est très dynamique, capable notamment de s'adapter pour accommoder les contraintes, développer ou transmettre des forces.

A l'échelle macroscopique, les tissus présentent des propriétés mécaniques très variables. Le tissu osseux par exemple, est très rigide et non cassant, tandis que les poumons ou encore les muscles possèdent un large domaine élastique pour soutenir sans dommage des déformations importantes. Ces caractéristiques se retrouvent à l'échelle de la cellule individuelle, et cellules épithéliales, fibroblastes, cellules musculaires, ostéocytes, ou encore neurones présentent des modules élastiques très différents. Des rigidités de la centaine de Pa (cellules mammaires) à quelques dizaines de kPa (cellules osseuses) sont ainsi représentées chez les cellules ([Janmey and McCulloch, 2007]). La réponse mécanique des cellules a été étudiée à l'aide de différents montages expérimentaux basés sur le même principe. Une force est appliquée et la déformation résultante est mesurée en amplitude et en phase. La différence entre ces études porte sur le type cellulaire et la sonde utilisée pour appliquer la force (particule colloïdale dans un piège optique ou magnétique, levier d'un microscope à force atomique, aspiration d'une micropipette, aiguille en verre ou encore microplaques de verre) ([Suresh et al. 2007]).

Les signaux mécaniques envoyés à une cellule par son environnement jouent un rôle tout aussi important que les signaux biochimiques dans sa physiologie grâce au phénomène de mécanotransduction. La rigidité de l'environnement peut guider la migration de cellules se déplaçant par reptation ([Lo et al. 2000]) ou encore déterminer le devenir d'une cellule ([Engler et al. 2006]), tout comme la tension générée par les cellules contractiles d'un tissu peut déclencher des cascades de réactions biochimiques dans celles d'un tissu voisin ([Zhang et al. Nat. 2011]).

La capacité des cellules à se déformer et à se déplacer est absolument fondamentale, et n'est rendue possible que par la capacité de celles-ci à exercer des forces sur leur environnement et sur elles-même. D'innombrables processus font en effet appel à ces fonctions dès le stade de l'embryogénèse : division cellulaire, migration cellulaire individuelle ou en tant qu'ensemble cellulaire d'un tissu ([Ridley Science 2003]), etc. Citons encore la nécessité de se déformer pour traverser des espaces étroits, comme par exemple un lymphocyte T se faufilant entre les cellules des parois des vaisseaux sanguins pour rejoindre une zone infectée des tissus.

Les cellules possèdent des points d'ancrage reliant leur squelette à la matrice extracellulaire appelés adhésions focales qui leur permettent d'agir physiquement sur leur environnement. Elles peuvent notamment exercer des forces de traction via leur cytosquelette. Ces forces peuvent s'exercer sur des distances très importantes par rapport à la taille typique d'une cellule (10  $\mu$ m), pouvant facilement atteindre l'échelle du tissus ([Choquet et al., 1997], [Trichet et al., PNAS 2012]).

Nous allons maintenant présenter chaque composant du cytosquelette, en nous attardant sur l'actine, dont les réseaux branchés font l'objet de cette thèse.

# 1.2 Le Cytosquelette

Un polymère est une molécule géante constituée d'unités répétitives, les monomères, qui s'assemblent en filaments. Ces filaments peuvent ensuite être agencés en réseaux. Le cytosquelette est constitué d'un ensemble de polymères réparti en trois catégories : actine, microtubules, et un groupe appelé filaments intermédiaires.

Le squelette cellulaire, comme son nom l'indique, donne une forme aux cellules. Il permet par exemple l'apparition de structures telles que les "doigts" d'exploration de l'environnement que sont les filopodes, ou encore les axones des neurones. La géométrie du squelette joue un rôle important dans le positionnement des organites au sein de la cellule [Yennek et al., 2014]. Il permet par exemple l'assymétrisation des cellules épithéliales, comme dans le cas de la paroi de l'intestin. Cette paroi est constituée de cellules dont les noyaux reposent sur la membrane basale tandis que la membrane apicale est organisée en rangées de microvillosités battantes.

Le cytosquelette est une structure très dynamique, en permanence en train de se renouveler, et très imbriquée. Ses différents composants interagissent en permanence ([Lopez et al. Nat. Com. 2014], [Kiuchi et al., 2015]). Dans le front de migration d'une cellule en déplacement sur une surface par exemple, filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires sont intimement entremêlés (comme des images en super-résolution le montrent bien, par exemple dans l'article Kiuchi et al. [2015]).

# **1.2.1** Actine : structures et partenaires

L'actine se présente sous forme de filaments polarisés appelés microfilaments d'environ 8 nm de diamètre, lesquels sont organisés en différentes structures par une myriade de protéines partenaires notées ABPs (pour "actin binding proteins"). Nous allons brièvement présenter ces partenaires avant de détailler les principales structures d'actine que l'on trouve dans la cellule.

## Partenaires de l'actine

De nombreuses protéines peuvent se lier à l'actine, et, en décorant ses filaments, changent leurs propriétés (souplesse, longueur, durée de vie), altèrent l'architecture des réseaux, leur dynamique (polymérisation, dépolymérisation, fragmentation), leurs propriétés (flexibilité, longueur). Les grandes familles des ABPs sont les facteurs de polymérisation comme les formines (qui génèrent des filaments uniques) ou le complexe Arp2/3 (qui génère des filaments branchés), les protéines de réticulation des réseaux, les protéines de coiffe (régulatrices de la taille des filaments), les protéines de désassemblage (qui cassent les filaments), et enfin les moteurs moléculaires.

Des protéines de réticulation, comme l'alpha-actinine chez les mammifères, sont capables d'agencer plusieurs microfilaments en fagots appelés fibres de stress, ou bien en réseau de filaments enchevêtrés et réticulés en "X", comme par exemple dans le cortex cellulaire. Les filaments peuvent aussi se trouver agencés les uns par rapport aux autres en un anneau contractile qui apparait lors de la mitose et aide la cellule à se scinder en deux.

La contractilité des réseaux d'actine est obtenue par la présence de myosines dites de type II dans le réseau (système acto-myosine). Ces protéines sont des moteurs moléculaires capables d'exercer une traction sur deux filaments voisins en s'accrochant sur les deux simultanément puis en changeant de conformation. Cette opération s'effectue avec une consommation d'énergie (rupture d'une liaison phosphate d'une molécule d'adénosine triphosphate, ou ATP), ce qui a fait qualifier ce type de phénomène d'"actif". D'une manière générale, tout processus hors équilibre thermodynamique qui s'accompagne d'une dissipation d'énergie par le réseau, comme par exemple la croissance de nouveaux filaments (dont nous discuterons en détail plus loin) est dit "actif". Nous reviendrons en détail sur ces ABPs et sur les protéines de réticulation en particulier au chapitre 2.

Les schémas présents dans la revue [Blanchoin et al., 2014] présentent bien les différents types de réseaux d'actine et les principales familles d'ABPs associées (dans les cellules mammifères), mais ne sont pas reproduits ici pour des questions de droits d'auteur.

#### Les Fibres de stress et l'anneau contractile

Les fibres de stress et l'anneau contractile résultent de l'assemblage de filaments antiparallèles en fagots par une protéine de réticulation. Les fibres de stress sont présentes en permanence dans la cellule, y créent une orientation, et surtout transmettent la tension au travers toute la structure. Elles sont présentes au niveau des adhésions focales qui connectent le cytosquelette à la matrice extracellulaire. L'anneau d'actine apparait lors de l'étape finale de la mitose : la scission en deux cellules-filles. Il s'assemble sur la plaque équatoriale, le long de la membrane, et est également constitué de filaments antiparallèles. Ces deux structures sont très décorées de myosines ce qui les rend contractiles (dans le cas des fibres de stress cela permet d'aider à rassembler l'arrière d'une cellule lorsque celle-ci migre par exemple). L'orientation des filaments au sein d'une structure d'actine conditionne la contractilité du réseau [Reymann et al., Science 2012].

# Le Cortex

Le cortex d'actine est un réseau réticulé qui se situe sous la membrane cellulaire. Il y est ancré, et est décoré de nombreuses myosines de type II qui le rendent contractile. Sa principale fonction est de donner une intégrité physique à la cellule en lui conférant une certaine résistance mécanique, mais il assure de nombreux autres rôles. Le cortex est par exemple responsable du phénomène de bourgeonnement des cellules : en se contractant, il permet de libérer un excès de membrane qui forme le "bourgeon". Des variations dans la contractilité du cortex permettent par ailleurs l'initiation de la cytokinèse lors de la division cellulaire des cellules animales. La transduction de l'information en signal physique au sein du cortex, à son tour déclencheur du processus de scission de la cellule est si important qu'il existe plusieurs voies indépendantes de transmission de l'information. Principalement, il semble que le faisceau mitotique positionne l'anneau contractile tandis que d'autres microtubules induisent une relaxation du cortex aux pôles de la cellule. Dans une cellule géante comme un ovocyte par exemple, où les microtubules sont trop peu nombreux et trop petits par rapport au volume à couvrir, il a été montré que le signal est transmis à la majeure partie du cortex via la combinaison d'un gradient d'une protéine essentielle du cycle cellulaire, la kinase cdk1/cyclinB et d'une voie de signalisation très conservée dans l'évolution (RhoA-NMY2) [Bischof et al.,Lenart group EMBL, Communication 2528 Plat. at American Biophysical Society Meeting 2016].

# Réseaux branchés : Lamellipodium et vésicules d'endocytose

Les réseaux branchés sont issus de la polymérisation de l'actine en présence d'Arp2/3, ABP initiatrice de branche. Cette protéine est recrutée par un activateur, lui-même préalablement recruté à la membrane là où le réseau est ensuite assemblé. On peut citer les membres de la famille WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein : N-Wasp, WAVE, ...) ou encore Abp1 ([Goode et al. J. Cell Biol. 2001]) dans le cas des cellules mammifères, et l'homologue de WASP dans le cas des levures, Las17.

Un exemple de stratégie de migration cellulaire à 2D particulièrement étudié est le lamellipode. Les cellules en mouvement sont très assymétriques, avec un très large bandeau d'actine au niveau du front de migration. Le réseau d'actine au sein du lamellipode est un réseau branché. Ce réseau exerce une force sur la membrane qui la pousse vers l'avant, et, ce, en l'absence de myosines de type II. Le mouvement au sein du front d'avancée de la cellule est quasi constant. La struture est très stable et se construit de manière progressive : au point le plus avancé des fillopodes, "doigts" membranaires reforcés par de l'actine font office de sonde, tandis que le lamellipodium grossit derrière eux. A l'arrière du lamellipode de nouveaux points d'adhésion fixés au substrat son régulièrement formés [Ponti et al., 2004]. La cellule subit une contraction de son cortex d'actine mais l'avant est ancré dans le substrat, et les points focaux de l'arrière se détachent ponctuellement, ce qui génère une avancée par à-coups de l'arrière de la celllule. Le mécanisme de croissance et de renouvellement du réseau branché à l'origine de la force développée dans le lamellipode est appelé "machinerie Arp2/3". Nous en discuterons plus en détail au chapitre 2.

Notons ici qu'à 3 dimensions plusieurs études semblent pointer vers un mécanisme différent pour les déplacements cellulaires : un déplacement amiboïde sans adhésion au substrat. A nouveau, le mécanisme consiste en la formation d'une protrusion à l'avant de la cellule suivi par une rétraction de l'arrière grâce au cortex d'actine. Cependant dans le cas à 3D, un bleb est rapidement formé à l'avant de la cellule en migration, et l'arrière le rejoint en se contractant. Cette fois c'est l'avant de la cellule qui avance par "catastrophes" tandis que l'arrière procède à un rythme plus constant. Il semblerait que la force de propulsion soit obtenue par la pression appliquée sur les parois de la martrice extracellulaire par la cellule et la directionalité grâce aux flux internes des composants du cytosquelette (flux vers l'arrière au niveau du cortex de la cellule). L'utilisation d'un substrat favorisant la formation de points d'adhésion focal fait chuter fortement la vitesse de ce type de déplacement. ([Charras and Paluch, 2008],[Bergert et al., 2015]).

L'endocytose désigne la capacité d'une cellule internaliser des nutriments ou tout autre particule. La cellule force sa membrane à s'invaginer de manière à envelopper la molécule d'intérêt au sein d'une vésicule qui se détache finalement de la membrane, à l'intérieur du cytoplasme. Dans le cas où l'endocytose est médiée par des protéines appelées clathrines (cas majoritairement trouvé dans les cellules mammifères et dans la levure bourgeonnante par exemple), l'étape de déformation de la membrane a lieu grâce à la polymérisation d'un réseau d'actine branché Arp2/3 au niveau de la zone d'endocytose. Ainsi, les réseaux Arp2/3 étudiés dans cette thèse sont impliqués dans les fonctions de migration des cellules mammifères et l'endocytose médiée par les clathrines).

# 1.2.2 Microtubules

Les microtubules sont des filaments de 25nm de diamètre rigides à l'échelle de la cellule, formés à partir de dimères de protéines globulaires, les tubulines. Ces dimères sont assemblés en filaments appelés protofilaments, eux-même agencés par groupes de 13 en un tube creux avec une extrémité dite "+" et une dite "-". La polarité des fibres y permet, comme pour l'actine, le déplacement de moteurs moléculaires processifs (kynésines, dynéines).

Ces moteurs moléculaires se déplacent le long des filaments en entrainant avec eux des vésicules "cargo", ce qui permet d'acheminer des molécules d'un point à l'autre de la cellule. Les microtubules jouent par ailleurs un rôle vital dans la division cellulaire, au cours de laquelle ils polymérisent depuis chacun des pôles de la cellule, se lient aux chromosome rassemblés sur le plan équatorial en fin de mitose et les tractent enfin vers les pôles. La force nécessaire est cette fois générée par la dépolymérisation rapide des microtubules à une extrémité (-).

# 1.2.3 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont caractérisés comme tels car ils partagent plusieurs propriétés : ils sont construits à partir de protéines filamenteuses et non globulaires, ne sont pas polarisés, et enfin n'interagissent avec aucun moteur moléculaire. Ces filaments sont les moins rigides du cytosquelette, mais ils peuvent former des réseaux qui sont, eux, très rigides. Les lamines par exemple, qui appartiennent à cette famille, ont un rôle de protection mécanique de la chromatine. Elles créent une coque rigide autour du noyau qui limite les dommages infligés à l'ADN lors d'une déformation de la cellule. La composition de ce réseau de lamines (c'est à dire le ratio de lamines de rigidités différentes), facteur essentiel de sa rigidité, varie même en réponse à celle du milieu [Harada et al. JCB 2014].

La kératine ([Ramms et al. PNAS 2013]), les neurofilaments ou encore la vimentine sont d'autres filaments intermédiaires, qui participent eux aussi à assurer l'intégrité de la cellule.

# **1.3** Construction des filaments d'actine

Intéressons nous maintenant plus en détail à l'actine, qui fait l'objet de cette étude. Nous allons décrire ici la composition des filaments d'actine, leur dynamique de polymérisation et quelques paramètres biochimiques et mécaniques qui sont spécifiques selon les espèces.

# 1.3.1 De la protéine globulaire au filament

L'unité de base du cytosquelette d'actine est une protéine globulaire (à laquelle nous nous référerons désormais par les mots "actine G"). Sa forme est particulièrement bien conservée entre les espèces. D'un poids de 42 kDa pour un diamètre de 5,4nm, elle est constituée de 375 acides aminés. La chaîne polypeptydique repliée en hélices alpha et feuillets beta forme deux lobes séparés par un sillon (en réalité quatre sous-domaines). Dans ce sillon vient se fixer 1 cation divalent (Ca2+ ou Mg2+) [Kabsch et al., Nature 1990] qui permet l'"ouverture" du sillon et l'accrochage d'une molécule d'ATP à l'intérieur en vue de la polymérisation. Les microfilaments obtenus ont un diamètre de l'ordre de 8 nm et sont constitués de deux protofilaments en hélice de pas 37 nm. De par sa structure en double hélice, toute addition d'une unité d'actine G augmente la longueur du filament de seulement 2,7 nm. L'actine G est assymétrique, la face vers laquelle pointe l'extrêmité C-terminale du monomère constitue le bout dit "barbé" (+), et le côté opposé le bout dit "pointu" (-). C'est cette assymétrie des monomères qui donne leur polarisation aux microfilaments, polarisation encore renforcée par la répartitions de l'ATP par rapport à l'ADP sur les filaments : du côté barbé, les monomères récemment incorporés portent un ATP, tandis qu'au bout pointu, les monomères, plus âgés, présentent une molécule d'ADP. L'actine de mammifère possède un second site d'accrochage pour un cation divalent, dit "site de rigidification" [Kang et al. 2012], qui change la structure du filament lorsqu'il est occupé, et, comme son nom l'indique, le rigidifie. L'absence d'un tel site sur l'actine de levure semble être la cause d'une des différences majeures entre les deux systèmes (voir paragraphe qui suit et chapitre 4).

## 1.3.2 Paramètres chimiques de croissance des filaments

Les extrémités des filaments d'actine sont en permanence en train de croître ou de rétrécir par ajout ou détachement de sous-unités à leurs extrêmités sans compromette leur intégrité. Selon l'état du monomère (lié à ATP ou ADP) et sa position (bout barbé, bout pointu) il va s'attacher ou se détacher plus ou moins facilement avec les constantes cinétiques, taux d'attachement  $(k_{on})$ et de détachement  $(k_{off})$  en  $(\mu M \cdot s)^{-1}$  et  $s^{-1}$  ([Pollard et al., 1986]). Pour l'actine, l'étape limitante de la formation d'un filament est la nucléation d'une amorce de 3 monomères, taille au-dessous de laquelle l'embryon de filament est trop instable et les monomères se séparent avant que l'élongation (rapide) du filament puisse commencer. Deux conditions sont nécessaires à la croissance : d'une part la force ionique de la solution doit écranter suffisamment les charges des monomères pour permettre l'auto-assemblage. D'autre part la concentration d'actine G doit être supérieure à une concentration critique, seuil de polymérisation ou de dépolymérisation, différente à chaque extrémité. Dans les cellules la concentration en actine G est généralement très supérieure au seuil de polymérisation, cependant des protéines peuvent se lier à l'actine et la séquestrer, ce qui limite la polymérisation [Pantaloni and Carlier, Cell 1993].

Par ailleurs, si la concentration d'actine G passe au-dessus d'un seuil : la concentration de monomères pour laquelle la vitesse de déploymérisation au bout pointu (noté -) est égale à la vitesse de polymérisation au bout barbé (noté +), le filament grandit. L'état d'équilibre, où autant de monomères s'ajoutent qu'il ne s'en ôte à l'autre extrémité du polymère est qualifié de treadmilling. Il est obtenu à une seule concentration de monomères d'actine notée  $C_{TM}$  sur la figure. ([Welch et al., 1998], [Carlier et al., 1984]).

# **1.3.3** Des Filaments semi-flexibles

La longueur de persistance est une propriété intrinsèque à un chaîne de polymère. Il s'agit de la distance sur laquelle l'orientation du filament perd sa corrélation. Elle est reliée au module de flexion du filament,  $\kappa$ , par la relation  $\kappa = L_P \cdot k_B T$ .

En comparant cette longueur de persistance à leur longueur de contour L, on peut classer les polymères en trois catégories : flexibles, semi-flexibles, et rigides.

Si L  $\gg$  Lp, les filaments sont flexibles. Les monomères prennent (presque) n'importe quelle orientation les uns par rapport aux autres et les filaments présentent un aspect de pelote. L'élasticité des polymères flexibles est dite entropique car leur réponse en extension ou en compression est régie par l'entropie de conformation. Ainsi, ils se rigidifient lorsqu'ils sont étirés à cause de la réduction du nombre de conformations accessibles ([Bustamante et al. 1994]).

Si  $L \ll Lp$ , les filaments sont rigides. La déformation des liaisons entre monomères au sein de la chaîne par rapport à leur position d'équilibre est à l'origine de la force de rappel qui apparait en cas de flexion. L'élasticité est, dans ce cas, d'origine enthalpique.

Enfin, si  $L \simeq Lp$ , les filaments sont semi-flexibles. C'est un régime intermédiaire où les fibres présentent les deux formes d'élasticité, entropique et enthalpiques : les filaments peuvent se déformer sous agitation thermique mais présentent une rigidification pour des contraintes bien moindres que les polymères flexibles.

La plupart des polymères biologiques (actine, microtubules, collagène, etc.) sont dits "semiflexibles" ([Storm et al. 2005]). La longueur de persistance des filaments d'actines a été mesurée entre 8 et 10  $\mu$ m chez les mammifères [Isambert JBC 1995], et seulement de 5 à 7  $\mu$ m chez la levure ([Kang et al. PNAS 2014],[McCullough et al., Biophys. J. 2011]).

Ces longueurs de persistance sont directement liées à la structure des filaments d'actine et des protéines partenaires de l'actine, lorsqu'elles décorent les filaments, peuvent agir sur sa flexibilité. L'un des exemples est la cofiline, étudiée pour sa capacité à favoriser la dépolymérisation des filaments en en déstabilisant la structure. Le tableau "Table 1" de l'article McCullough et al. [2011] illustre bien cette notion, mais n'est pas reproduit ici pour des auestions de droits d'auteur.

# 1.4 Mesures mécaniques sur gels d'actine reconstitués in vitro

Depuis les années 1990, la recherche sur les réseaux d'actine a bénéficié du développement de nombreuses techniques, dont une partie est adaptée à l'étude de gels de polymères. Nous ferrons dans la seconde partie de cette section un tour d'horizon des méthodes de mesures et résultats relatifs à l'analyse de la mécanique des réseaux branchés d'actine. Pour décrire la mécanique d'un réseau de polymères, on essaie d'accéder expérimentalement à des paramètres et des temps caractéristiques. On peut en citer un certain nombre qui sont très couramment rencontrés dans les études expérimentale des réseaux de biopolymères : le module élastique ou module d'Young, E, qui relie la contrainte ( $\sigma$ ) et la déformation ( $\varepsilon$ ) d'un matériau et quantifie sa rigidité, et le module de cisaillement G, dans le cas d'une contrainte en cisaillement. Les modules complexes, constitué d'une partie réelle appelée module de conservation et d'une partie imaginaire appelée module de perte, qui renseignent sur le caractère visco-élastique des gels. Le coefficient de poisson qui décrit la compressibilité du matériau, a été évalué une fois pour un réseau d'actine enchevêtré ([Gardel et al., PRL 2003]), et sa mesure demeure un défi expérimental à ce jour. Dans le cas de matériaux au comportement linéaire, E suit la loi de Hooke ( $\sigma = E \cdot \varepsilon$ ), mais dans le cas d'un matériau non-linéraire, c'est le module différentiel K qui est utilisé :  $K = \frac{d\sigma}{d\varepsilon}$ . Il s'obtient en faisant osciller de manière sinusoïdale une contrainte exercée sur le matériau autour d'une valeur de pré-contrainte choisie.

# 1.4.1 Réseaux d'actine en solution

Polymérisés en solution, les réseaux d'actine sont peu denses (quelques dizaine de micromolaire d'actine au maximum) comparés à la situation *in vivo* (quelques centaines de micromolaires dans le lamellipode par exemple [Koestler at al. 2009]). Les filaments forment un réseau tridimensionnel allant d'un bout à l'autre de l'échantillon, ce qui suffit à lui conférer des propriétés viscoélastiques. Cependant ces systèmes peu denses, isotropes et désorganisés sont très éloignés des sytèmes d'actine biologiques denses, organisés et polarisés ([Stricker et al. 2010]).

Ces gels peuvent être obtenus sur des volumes suffisamment grands pour être étudiés à l'aide de rhéomètres classiques, avec lesquels la déformation en réponse à une contrainte sinusoïdale peut être mesurée, mais des techniques de microrhéologie consistant à incorporer des billes micrométriques dans les gels et à suivre leur diffusion sont également utilisées pour déterminer les paramètres caractéristiques du matériau. Les déplacements quadratiques moyens des particules, qui diffusent en étant gênées par les filaments environnants, permettent de remonter au module de cisaillement et au module de perte du matériau ([Schmidt et al. 2000],[Bausch and Kroy, 2006]).

Le module élastique des gels enchevêtrés varie en fonction de la concentration en actine et de la fréquence de sollicitation de la mesure, de 0,01 à 1 Pa ([Hinner et al. 1998], [Gardel et al. 2003]). Un consensus a établi en 1998 que pour 1 mg.mL<sup>-1</sup>1 d'actine et des fréquences de sollicitation de 0,1 à 1 Hz, il est de l'ordre de 1 Pa ([Xu et al. 1998]).

#### Rhéologie des gels d'actine réticulés

L'avantage des gels d'actines reconstitués *in vitro* réside dans le fait que les paramètres biochimiques sont contrôlables. On peut ajouter à ces gels n'importe quelles protéines de liaison à l'actine (que nous noterons ABPs) purifiée, telles que des protéines de réticulation, qui établissent des points d'attache entre filaments d'actine, ou encore des moteurs moléculaires qui vont tirer sur les filaments, etc.

En présence de protéines de réticulation (ou autres agents de réticulation), le module de cisaillement mesuré augmente de 0,1 à 300 Pa avec le rapport concentration de protéines de réticulation/concentration d'actine [Gardel et al. 2003]. Une forte rigidification sous contrainte est par ailleurs observée, ce qui traduit un comportement non linéraire ([Gardel et al. 2004],[Bathe et al. 2008], [Claesens et al. 2006], [Lielig et al. 2007], [Heussinger et Frey, 2007]).

La dynamique des protéines de réticulation joue également un rôle sur la mécanique des réseaux obtenus ([Wachsstock et al. Biophys. J. 1994], [Lielig et al. Nat. Mat. 2011]) : Des variations des propriétés visco-élastiques observées sur les tests en fréquence en fonction des

rapports "concentration de protéines de réticulation"/"concentration d'actine" et du type de protéine de réticulation en jeu. Ces variations sont attribuées à des effets de détachement des protéines de réticulation sous force d'une part ([Tharmann et al. PRL 2007]), et de changement de l'architecture du réseau d'autre part. Il a en effet été montré que selon leur concentration, les protéines de réticulation pouvaient générer des réseaux isotropes de filaments enchevêtrés et liés, ou bien de fagots de filaments parallèles (ou antiparallèles) [Wachsstock et al. Biophys. J. 1993]. De plus, la concentration de transition entre les deux phases dépendraient de la taille et de la dynamique des protéines de réticulation.

En ce qui concerne la prédiction de la réponse fréquentielle des gels de polymères semiflexibles réticulés, les modèles viscoélastiques simples comme celui du fluide de Maxwell, qui représente les réseaux comme un ressort et un amortisseur en série, ou celui de Kelvin-Voigt (un ressort et un amortisseur en parallèle) ne rendent pas compte de la multiplicité des temps de relaxations des réseaux dus à la dynamique propre des protéines de réticulation. La prise en compte des événements indépendants de détachement et rattachement qui ont lieu à basse fréquence permet par exemple au modèle "cross-link-governed dynamics model" d'améliorer la prédiction pour ces fréquences par rapport au modèle de Maxwell ([Broedersz et al., PRL 2010]).

De nombreuses questions restent ouvertes sur la conformation locale des filaments au sein des réseaux réticulés dans la cellule, où plusieurs protéines de réticulation différentes sont généralement présentes, et en compétition pour l'accrochage à l'actine. Les études de gels *in vitro* permettent une complexification progressive du système, que ce soit par le mélange de plusieurs protéines de réticulation, l'ajout de protéines comme les moteurs moléculaires, qui, dans un réseau réticulé, peuvent appliquer des forces de traction sur les filaments (en présence d'ATP) et générer ainsi des contraintes internes ([Koenderink et al. 2009]) ou encore par l'ajout d'ABPs permettant la croissance de réseaux dynamiques (fonctions de renouvellement du réseau par exemple). D'autres études s'intéressent par ailleurs à l'intéraction des différents éléments du cytosquelette et font polymériser ensemble de l'actine et des microtubules ou des filaments intermédiaires [Lopez et al. Nat. Com. 2014]. Les systèmes où de l'ATP (c'est à dire de l'énergie) est consommé sont hors équilibre et sont dit actifs. Les réseaux d'actine branchés, dont nous allons parler dans le paragraphe suivant, appartiennent à cette catégorie.

# 1.4.2 Réseaux denses polymérisés depuis une surface

Contrairement aux réseaux d'actine polymérisés en solution, les gels polymérisés depuis une surface de quelques dizaines de micromètres carrés sont polarisés et denses, beaucoup plus proches de l'architectures des réseaux cellulaires.

L'identification dans les années 90 de la machinerie à l'origine de la croissance des réseaux branchés du lamellipode et des sites d'endocytose dépendante des clathrines a permis de reconstituer de tels réseaux *in vitro* à la fois à partir d'extraits cellulaires et à la fois à partir de mélanges de protéines purifiées comprenant un nombre variable de représentantes des familles protéiques impliquées dans la croissance de tels réseaux ([Loisel et al., 1999], [Cameron et al., 1999], [Bernheim-Groswasser et al., 2002]). Les détails sur les familles de protéines impliquées dans la croissance des réseaux branchés d'actine et la machinerie Arp2/3 sont donnés au chapitre 2. Intéressons nous ici aux mesures mécaniques réalisées sur ces réseaux branchés.

Historiquement, deux méthodes ont permis d'étudier la mécanique des réseaux branchés : l'AFM et un système de manipulation à l'aide de micropipettes.

#### Mesures à l'aide de micropipettes : étude de gels de protéines purifiées

Le groupe de C. Sykes a mis au point un montage sur lequel les réseaux d'actines branchés sont polymérisés à partir d'une bille de polystyrène de 2  $\mu$ m de diamètre (dont la surface est fonctionnalisée par un activateur d'Arp2/3, cf figure ?? A.). La bille est collée à une tige flexible de verre de 0,3  $\mu$ m de diamètre environ, montée sur une micropipette, dont la rigidité est calibrée à chaque expérience. Un activateur de Arp 2/3 est alors amené au contact de la surface de la bille par une micropipette pour qu'il s'y adsorbe. Marcy et al. (PNAS 2004) ont travaillés sur des réseaux reconstitués à partir d'un set de protéines purifiées de mammifères (actine, Arp2/3, une protéine de coiffe : gelsoline, une protéine de désassemblage : ADF, une protéine empêchant la nucléation spontanée de filaments d'actine : profiline). La tige porteuse de la bille fonctionnalisée est plongée dans le milieu de croissance et le réseau branché qui se développe à partir de la surface de la bille (appelé comète d'actine) est capturé par aspiration par une autre micropipette. Un piezzoélectrique permet ensuite de contrôler très finement les déplacements de cette pipette, tandis qu'une observation microscopique permet, en mesurant les déplacements de la bille, de remonter à la déflexion de la tige de verre.

Ce montage expérimental, conçu pour quantifier les forces en jeu dans la propulsion d'objets par la polymérisation de réseaux d'actine branchés, permet d'appliquer des forces allant jusqu'à 4,3 nN. La vitesse de croissance des réseaux diminue avec l'augmentation de la force suivant une courbe de forme convexe. Le modèle du brownian ratchet ([Mogilner et Oster, 2003]) prédit une décroissance rapide de la vitesse aux faibles forces, et une décroissance plus modérée aux grandes forces qui correspond à l'allure de la courbe obtenue par Marcy et al.

Le module de Young a pu être déterminé pour ces réseaux en sollicitant le gel (traction) à une vitesse supérieure à la vitesse de croissance des gels en l'absence de force. Le gel est alors soumis à une déformation élastique (la contribution de la croissance du réseau est négligeable) et la pente de la courbe force-élongation donne la rigidité du réseau. Le module d'Young calculé à partir de ces mesures vaut 3700 Pa en moyenne (avec des valeurs extrêmes à 700 Pa et 6700 Pa).

# Mesures avec un AFM

#### Etude sur extraits cellulaires

Le groupe de D. Fletcher a fait polymériser des gels d'actine branchés depuis la surface du cantilever d'un AFM fonctionnalisée sur environ 200  $\mu m^2$  avec un activateur de Arp2/3. Les gels croissent à partir d'un extrait cytoplasmique d'oeufs de grenouille *Xenopus laevis*. Une fois que les gels ont atteint la surface du substrat opposé au cantilever, il est possible de contrôler la force appliquée sur les gels ([Parekh et al. 2005]). Des forces de quelques dizaines à quelques centaines de nanonewton sont appliquées. La mesure de la relation en précontrainte et vitesse de croissance donne cette fois une diminution de la vitesse avec la force selon une courbe concave. Ici c'est un modèle dit modèle auto catalytique, proposé par Carlsson (2003) qui permettrait d'expliquer l'allure de la courbe : l'hypothèse avancée est que le taux de branchement est proportionnel au nombre de filaments au contact de l'obstacle. L'augmentation de la contrainte augmente le nombre de filaments en contact avec la surface fonctionnalisée, et le taux de branchement augmente donc aussi. Jusqu'à un certain seuil, la vitesse d'élongation est peu affectée par la contrainte puisque la force ressentie par filament demeure presque constante.

En ce qui concerne l'étude de la relation entre force exercée sur le réseau et vitesse de croissance des gels, les deux expériences relatées ci-dessus donnent des résultats différents, correspondant à des dynamiques des réseaux différentes. Une différence majeure entre les deux système est l'utilisation d'extraits cellulaires dans un cas et d'un petit nombre de protéines purifiées dans l'autre. Il est donc nécessaire de réaliser des études complémentaires pour combler l'écart entre ces deux résultats. Outre la mesure de la relation entre force exercée sur le réseau et croissance, ce montage permet d'explorer plus de paramètres mécaniques que l'expérience de manipulation avec micropipettes. Chaudhuri et al. (2007) se sont intéressés au comportement viscoélastique du gel sur une gamme de fréquence de 0,1 à 10 Hz. Le module de Young E à faible pré-contraintes est de l'ordre de 1000 Pa et varie faiblement en fréquence (fonction de  $f^{0,13}$ ). Le module de perte est très inférieur au module élastique à basses fréquences et rejoint E autour de 1 Hz. Les valeurs du module d'Young pour ce système ainsi que celles mesurées au cours de l'expérience de Marcy et al. (PNAS 2004) sont du même ordre de grandeur que les modules mesurés sur cellule entière.

Un comportement non linéraire est observé : à partir d'une valeur de contrainte normalisée de 0,1, les gels répondent de manière plus rigide. A partir de 1 cette réponse s'inverse et les gels s'amollissent. Cette modification est réversible : lors de la décharge l'hystérèse est nulle sur la partie ramollissement sous contrainte et très faible sur la partie rigidification sous contrainte. Cette phase d'amollissement réversible n'avait jamais été rapportée. La rigidification sous contrainte avait elle été observée sur les réseaux en solution réticulés ([Gardel et al. 2004] [Gardel et al. 2006], [Storm et al. 2005]).

Les auteurs attribuent ce changement de régime au passage d'un mode de déformation en extension de certains filaments des réseaux au flambage réversible d'autres filaments soumis eux à une compression par leur orientation par rapport à la contrainte. La réversibilité des déformations est expliquée avec l'hypothèse que les points de réticulations ne sont pas endommagés.

# Etude sur protéines purifiées

Récemment, Bieling et al. (groupes de D. Fletcher et R. Mullins [Cell 2016]) a montré sur des réseaux assemblés à partir d'actine, d'Arp2/3, de protéines de coiffes et de profiline sur un AFM que la pré-contrainte avec laquelle croissent les réseaux est en réalité primordiale car elle conditionne les propriétés mécaniques des réseaux. Tout d'abord le module élastique d'un gel dépend de la pré-contrainte de croissance. Ensuite, dès que la contrainte appliquée pour la mesure dépasse la contrainte auquel un gel était soumis durant sa croissance, une déformation plastique des gels est enregistrée. Les auteurs émettent l'hypothèse que la capacité des réseaux d'actine branchés à s'écraser pourrait faire parti d'une stratégie d'adaptation des cellules aux contraintes : en cas d'augmentation de la sollicitation, les anciens réseaux seraient spontanément écrasés, laissant la place à de nouveaux réseaux adaptés.

Par ailleurs il est montré dans cette étude que la dépendance du module élastique avec la concentration d'actine est beaucoup plus faible que dans les situations de gels polymérisés en solution.

#### Développement d'un nouveau système de mesure

Les expériences rapportés précédemment ont le défaut de produire peu de points de mesure. Pour palier à cela, l'équipe de Olivia du Roure et Julien Heuvingh a mis au point une méthode à haut débit basée sur l'utilisation de billes superparamagnétiques. C'est la méthode qui est utilisée pour cette thèse et son principe est détaillé au chapitre 2. Pujol et al. (PNAS, 2012) ont pu, grâce à ce système, explorer de manière quantitative et systématique plusieurs compositions de réseaux Arp2/3 reconstitués et il a ainsi été mis en évidence pour la première fois une dépendance de l'élasticité des réseaux avec la concentration de protéines de coiffe (qui limitent la taille des filaments en bloquant leur croissance) et avec la concentration en protéine de branchement. Les réseaux se rigidifient fortement lorsque la concentration en l'un de ces deux composés est augmentée. Par ailleurs, une très faible dépendance de l'élasticité avec la longueur de persistance des filaments de ce système, une faible rigidification des gels avec la pré-contrainte (similaire à celle observée par Chaudhuri et al.), et la forte dépendance de E avec la concentration en Arp2/3 ont permis de conclure que l'élasticité des réseaux d'actine branchés a une importante composante enthalpique.

Dans sa thèse Pierre Bauër a amélioré le système de mesure par la mise en place avec Joseph Tavacoli d'un protocole de fabrication de colloïdes magnétiques de forme contrôlée, qui donne accès à une immense variétés de types de mesures ([Tavacoli et al. 2013]) : mesures sur cellules décrites dans la section précédente avec des blocs magnétiques, mesures dans des gradients de champs locaux avec des pointes, remplacement des billes superparamagnétiques par des cylindres, etc. Cela lui a notamment permis de mesurer la relation entre vitesse de croissance et contrainte appliquée de manière facile (interfaces planes des microindenteurs en contact), précise (imagerie de la position des microindenteurs à tout moment et connaissance de la force appliquée), et à haut débit sur des réseaux d'actine branchés reconstitués à partir de protéines purifiées de mamifère. Des questions comme la différence de réponse présentée par les courbes force-vitesses établies par Marcy et al. (2004) et Parekh et al. (2005) pourraient dans le futur être résolues grâce à l'apport de suffisamment de mesures expérimentales sur des systèmes de différentes compositions biochimiques.

# Chapitre 2

# Enjeux de cette étude et démarche expérimentale

L'APPROCHE expérimentale choisie pour cette thèse est basée sur la combinaison de deux méthodes développées par Olivia du Roure, Julien Heuvingh et Thomas Pujol d'une part, et par Alphée Michelot et Audrey Guillotin d'autre part. Ce chapitre nous permettra de décrire le système biologique en jeu, la levure bourgeonnante, ainsi que les principes physiques sousjacents à la technique expérimentale de mesure des propriétés mécaniques que nous utilisons au laboratoire.

Nous nous intéressons aux propriétés mécaniques des gels d'actine branchés, en lien avec leur composition biochimique.

Il est possible de reconstituer *in vitro* des gels d'actine à partir d'un mélange de protéines purifiées ou bien à partir d'extrait cellulaire. La technique couramment utilisée consiste à reproduire *in vitro* une machinerie biochimique bien connue appelée machinerie Arp2/3 pour assembler un gel d'actine dont la structure est proche de celles des structures cellulaires. Cette machinerie repose sur le complexe Arp2/3 qui, une fois activé, permet de générer de nouvelles branches et ainsi d'assurer la polymérisation d'un réseau. Une intense activité de recherche autour des années 1990-2000 a montré qu'il suffit de greffer des billes avec l'activateur d'Arp2/3 et de les mettre en présence de quelques protéines (actine, Arp2/3 et protéines de coiffe au minimum) ou d'un extrait cellulaire ([Loisel et al., 1999]; [Cameron et al., 1999]; [Bernheim-Groswasser et al., 2002]) pour générer le polymérisation d'un gel d'actine dense et branché. La machinerie Arp2/3 est très conservée dans l'évolution et se retrouve chez la majorité des eucaryotes.

Chez la levure, les réseaux branchés sont présents uniquement au niveaux des sites d'endocytose. Leur croissance fait appel à la machinerie Arp2/3, comme dans le cas de la construction d'un lamellipode chez une cellule animale en migration. Il a été montré que la protéine Las17 (homologue de WASP) suffit a initier la croissance de ces réseaux dans un extrait cellulaire [Michelot et al., 2010]. L'adsorption de Las17 purifiée à la surface de billes colloïdales nous permet de faire pousser les réseaux branchés Arp2/3 de la levure tout autour des billes. Nous utilisons des colloïdes magnétiques pour tester les propriétés mécaniques des gels qui les entourent car il est possible de générer une force dipolaire attractive entre eux. Cette force est modulable, ce qui nous permet d'appliquer des sollicitations de différentes formes sur les gels tout en enregistrant la réponse par microscopie optique.

La levure est un organisme sur lequel les manipulations génétiques sont faciles à réaliser. Nous disposons d'une banque de mutants pour différentes protéines partenaires de l'actine dont nous pouvons tester la mécanique et la comparer à la souche sauvage. Cette approche est complétée par l'analyse de la mécanique de réseaux branchés d'actine de levure simplifiés reconstitués à partir d'un nombre minimum de protéines différentes purifiées.

# 2.1 La levure bourgeonnante : un organisme modèle

La levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae*, est un organisme modèle eucaryote couramment utilisé en biologie car il présente de nombreux avantages pour les manipulations génétiques. Tout d'abord son génome a été intégralement séquencé et n'importe quel point peut y être pris pour cible afin d'insérer un marqueur, altérer la fonction d'une protéine ou inhiber son expression, ou à l'inverse forcer la cellule à la surexprimer [Costanzo et al. Science 2016]. Son temps de génération est très faible comparé aux générations mammifères ou même à d'autres organismes modèles comme le poisson zèbre ou encore le xénope, ce qui permet de créer des banques de mutants très fournies et de tester un grand nombre de combinaisons, chose irréalisable avec tout autre organisme eucaryote. Parallèlement à cela son taux de mutation spontané est bien plus faible que celui des bactéries, ce qui permet de maintenir une lignée génétiquement modifiée bien plus longtemps, ou du moins avec une meilleure confiance dans les allèles exprimés par l'organisme. Pour finir il ne s'agit pas d'un organisme fragile (par opposition à certaines lignées cellulaires humaines par exemple), et son maintien et sa culture se font donc dans des conditions relativement simples.

## 2.1.1 Les structures d'actine

La levure est un organisme unicellulaire eucaryote qui possède des structures d'actine dans son cytosquelette. On trouve chez elle des câbles d'actine, un anneau contractile et des réseaux branchés couvrant les invaginations de la membrane lors de l'endocytose. Amberg [1998] présente des images prises sur la levure *S. cerevisiae* au cours d'un cycle cellulaire de bourgeonnement complet. L'actine y a été marquée par de la phalloïdine conjuguée à la rhodamine afin de repérer les différentes structures présentes dans ces cellules : câbles d'actine, anneau contractile et patchs d'endocytose sont nettement visibles. En revanche cet organisme ne possède pas de cortex. La levure est munie d'une matrice extracellulaire rigide appelée paroi cellulaire qui lui suffit à maintenir son intégrité physique [M. Kaksonen, Actin-based Motility, chap 4., Ed. Carlier, 2010]. De toutes les structures de l'actine, seules celles recouvrant les invaginations de la membrane aux sites d'endocytose sont composées d'actine branchée, assemblée par le mécanisme d'Arp2/3. En effet la levure est un organisme non motile et ne possède donc pas de lamellipode.

Lors de la division, la paroi cellulaire est digérée en un point donnée, ce qui relâche la contrainte sur la membrane et lui permet de former une protubérance. Une fois le matériel génétique et protéique nécessaire transféré dans celle-ci, un anneau contractile d'actine est formé au point de scission et aide à rapprocher les membranes à fusionner. Chaque division est l'occasion pour la cellule de remodeler sa paroi cellulaire.

# 2.1.2 Réseaux d'actine branchés : les sites d'endocytose

L'endocytose est un processus fondamental de la vie des cellules, par lequel elles peuvent absorber des composés externes sans nuire à l'intégrité du cytoplasme. Ce phénomène joue également un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la membrane, en compensant l'accroissement de sa surface dû à l'exocytose. La membrane s'invagine de manière à envelopper les molécules à internaliser puis la vésicule ainsi formée se referme et se détache de la membrane à l'intérieur du cytoplasme, où elle est digérée par la cellule. Les nutriments comme les molécules de signalisation cellulaire sont absorbés de cette manière par les cellules.

De nombreuses étapes de ce processus fondamental ne sont pas encore comprises, c'est pourquoi l'endocytose est très étudiée. Il est admis que les réseaux branchés d'actine qui génèrent les forces nécessaires à l'invagination de la membrane se construisent autour des puits d'endocytose suivant le modèle de la "machinerie Arp2/3", qui sera présenté plus loin. Bien que la plupart des protéines impliquées dans les réseaux d'actine branchés de *S. cerevisiae* aient des homologues chez les mammifères, une différence importante a été relevée concernant l'endocytose médiée par les clathrines dans ces deux organismes : pour la levure, un squelette d'actine fonctionnel est primordial pour permettre l'endocytose, tandis que les cellules mammifères parviennent à internaliser des vésicules sans son aide [Aghamohammadzadeh et al., 2009]. Il apparait que l'actine est nécessaire pour générer des forces supérieures à celles dues à la pression de turgescence de la levure. Cette particularité fait de la levure un encore meilleur modèle pour l'étude de la mécanique des réseaux d'actine branché car tout défaut de structure dans les réseaux d'actine ayant un impact sur leur mécanique pourront être reliés à un phénotype d'endocytose.

# Assemblage des patchs endocytiques

Chez S. Cerevisiae, l'endocytose est de type "dépendant des clathrines" car ces protéines sont parmi les premières à être recrutées sur le site activé de la membrane [Kaksonen et al. 2005]. De très nombreuses protéines de différentes familles sont ensuite ajoutées par vagues successives à ce manteau, dont, parmi les dernières, des activateurs de Arp2/3. Une fois que l'actine est à son tour assemblée en un réseau dense, branché et réticulé, on parle de patch endocytique [Weinberg et Drubin, 2012].

L'ensemble du processus d'endocytose ne s'étale que sur une durée de l'ordre de 2 à 3 minutes, mais est répété très souvent (le nombre de patch endocytiques chez la levure à fission est proportionnel à la longueur de la cellule; [Berro et Pollard, MBoC, 2014]) et est extrêmement régulier. Seulement 15 à 20 secondes de ce temps sont nécessaires à la construction de la structure d'actine branchée. Durant cette phase plus de 30 protéines différentes sont incorporées au système dans un ordre précis, dans un laps de temps de 5 à 7 secondes [Goode, Eskin, Wendland, 2015].

#### Invagination de la membrane

Les levures sont des organismes turgescents soumis à de très fortes pressions (de l'ordre de 1 MPa pour la levure à fission [Minc et al., 2009] à 1,5 MPa pour la levure bourgeonnante [Schaber et al., 2010). Cela implique que les patchs d'actine doivent générer une force suffisante pour contrecarrer cette pression et permettre le mouvement d'invagination de la membrane. La force nécessaire est estimée autour de 1 nN pour des invaginations de 24 nm de diamètre ([Basu et al. Mol. Biol. Cell, 2014). Les modèles simples reposant sur le nombre d'extrémités barbées dans les patchs (de l'ordre de 140, avec plus de 100 complexes Arp2/3 d'après les estimations pour la levure à fission [Berro et al. 2010]) ne suffisent pas à prédire les 1000 nN de force attendus par  $\mu m^2$ . Une coopération de l'actine et de moteurs moléculaires de type I ancrés à la membrane pourrait permettre d'expliquer une partie du mécanisme [Sirotkin et al., 2010]. La compréhension du mécanisme d'invagination de la membrane plasmique lors de l'endocytose pourra augmenter avec la résolution de questions comme celle de l'orientation des filaments d'actine au niveau des patchs. Un modèle se basant sur le principe de l'amplification mécanique par un pivot, où l'actine polymérise parallèlement à la membrane et agit comme une "cale" qui pousse l'invagination vers l'intérieur (le rôle de pivot est assuré dans ce cas par le reste du réseau d'actine très connecté) permettrait d'expliquer la génération des forces nécessaires à l'endocytose ([Dmitrieff et Nedelec, JCB, 2016). Le détail des structures des patchs d'endocytose n'est pour l'instant pas accessible à l'imagerie.

# 2.2 Reconstitution des réseaux d'actine des patchs endocytiques in vitro

Des études précédentes ont permis de détecter les partenaires de l'actine qui déterminent la dynamique d'assemblage et l'architecture du réseau dans les patchs endocytiques. L'utilisation de Las17 purifiée permet de reconstituer des réseaux branchés très denses *in vitro*, que ce soit à partir d'extrait cellulaire (ensemble des protéines de la cellule) ou d'un set de protéines sélectionnées et purifiées.

# 2.2.1 Croissance sur billes colloïdales fonctionalisées

La méthode de reconstitution de patch endocytiques de la levure *in vitro* a été développée par A. Michelot [Michelot et al., Curr. Bio. 2010] :

la polymérisation démarre depuis une surface décorée par la protéine Las17 (une adsorption non spécifique de la protéine purifiée sur la surface suffit), plongée dans un extrait des protéines cellulaires solubles. Le réseau croît en une couverture homogène très intriquée (voir figure 2.1). Les gels obtenus de cette manière sont très denses et l'actine y est beaucoup plus concentrée que dans des expériences où les réseaux sont polymérisés dans tout le volume de la solution. Un tel système est le plus proche des conditions biologiques cellulaires que l'on puisse obtenir *in vitro*.

Les réseaux obtenus sont analysés par MudPIT (multidimensional protein identification technology) ([Florens et al. Nature, 2002]). Cette technique est spécialement conçue pour l'identification des composés protéiques de mélanges complexes : les peptides récupérés autour des billes sont pré-triés par chromatographie multidimentionnelle en phase liquide puis analysés par spectrométrie de masse. La technique est si sensible que des protéines en solution dans le milieu mais non intégrées aux gels sont aussi détectées. Les résultats obtenus sont comparés à des échantillons contrôle (sans Las17 sur les billes) et seuls les peptides sur-représentés sont pris en compte. Il résulte de cette double analyse que plus de 90 protéines sont présentes dans les réseaux branchés reconstitués.

La croissance des réseaux autour des billes atteint un état stationnaire en terme de hauteur des gels. La stabilisation de cette "coque" de gel peut être due aux branchements et aux points de réticulation créent des points d'attache entre filaments. Il a été montré que comme ce réseau très connecté est sans cesse repoussé vers l'extérieur par la croissance de nouveaux filaments au niveau de la surface de la bille un stress interne apparait. La contrainte est tangentielle et maximale à la surface du gel, et ces couches externes du gels exercent à leur tour une contrainte (radiale cette fois) sur la zone au contact de la bille. Ces contraintes internes peuvent être responsables de la stabilisation de la hauteur des gels [Noireaux et al., Biophys. J. 2000].



FIGURE 2.1 – Image de microscopie électronique de gels de levures polymérisés autour de billes polystyrènes (réalisée par A. Michelot et Tatyana Svitkina).

La figure 2.1 illustre le type de gel que l'on obtient avec ce protocole. Il s'agit de la photographie au microscope électronique des patchs endocytiques de levure de type sauvage reconstitués autour de billes polystyrène. On y distingue des réseaux de filaments très denses et emmêlés, avec une diminution de la densité lorsque deux gels se mélangent, et une sorte de couronne fine de filaments moins denses autour des gels simples. Les gels mesurent de 0,5 à 1 $\mu$ m d'épaisseur et les billes de support sont des billes polystyrène d'1 $\mu$ m de diamètre (Polybead Microspheres, Polysciences). Elles ont un aspect non sphérique car ont été partiellement écrasées lors de la préparation de l'échantillon.

# 2.2.2 Les comètes d'actine

Si la croissance d'un gel ne démarre que sur une face de la bille-support, ou si les contraintes s'accumulent dans le réseau jusqu'à déclencher une fracture (et, alors, une brisure de la symétrie du gel), on observe l'apparition de ce que l'on appelle des comètes d'actine [van der Gucht et al., PNAS 2005].

Ces comètes ont été observées pour la première fois autour de bactéries, *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri*. Ces organismes possèdent des marqueurs membranaires assurant leur internalisation par les cellules hôtes. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, elle présentent à leur surface des protéines de recrutement de la machinerie Arp2/3 qui leur permettent de déclencher la croissance de réseaux d'actine branchés depuis leur membrane en utilisant le matériel protéique de la cellule infectée [Welch et al., Nature, 1997]. Les forces générées par ce réseau d'actine en croissance propulse la bactérie à des vitesses de l'ordre de  $0.5 \mu$ m/s qui lui permettent de passer de cellule en cellule et d'échapper au système immunitaire de l'hôte ([Theriot et al., Nature 1992].

Les comètes sont composées de familles de protéines analogues à celles des patchs endocytiques (ou les lamellipodes). Elles sont notamment caractérisées par leur vitesse de croissance, comparable à celle de l'assemblée de l'actine dans les patchs endocytiques. La génération de force par les réseaux d'actine en l'absence moteur est généralement étudiée au travers de ce phénomène ([Marcy et al., PNAS 2004], [Parekh et al. 2005], [Bieling et al. 2016]) car un système *in vitro* est beaucoup plus facile à manipuler et à analyser que son équivalent intracellulaire. Il est aisé de jouer sur sa composition pour décortiquer les éléments et mécanismes en jeu.

Dans le cas des gels d'actine branchés reconstitués à partir d'extrait de levure, un faible pourcentage des réseaux générés autour des billes forme des comètes et les propulsent. L'apparition de ces comètes peut servir de moyen de contrôle de l'activité normale des protéines de l'extrait.

# 2.3 Partenaires de l'actine dans les réseaux branchés et machinerie Arp2/3

# 2.3.1 Protéines partenaires de l'actine dans les réseaux branchés

Les protéines partenaires de l'actine sont directement responsables de l'architecture des réseaux et donc de leurs propriétés mécaniques. Nous présentons dans cette section les principaux partenaires de l'actine dans les réseaux branchés de la levure, dont le complexe Arp2/3, responsable de la nucléation des filaments d'actine dans ces réseaux et des points d'attache en "Y" entre filaments, mais aussi la famille des protéines de réticulations, qui lient plusieurs filaments entre eux en générant des points d'attache en "X".

# Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est constitué de 7 protéines, Arp2, Arp3, Arc15, Arc18, Arc19, Arc35 et Arc40 présent aussi bien chez la levure que chez les cellules mammifères. Deux de ces sous-unités, Arp2 et Arp3 ont la particularité d'avoir une structure analogue à celle des monomères d'actine. Le complexe se lie à un filament d'actine existant et initie la croissance d'un autre filament à partir de ce point. Le mécanisme pour cette fonction serait l'imitation d'une amorce de filament classique par l'ensemble formé par les deux sous-unités Arp2 et Arp3 et un monomère d'actine [Robinson et al., Science 2001].

# Facteurs de promotion de la nucléation : Las17

Le complexe Arp2/3 est lui-même recruté à la membrane et activé par des NPFs, dont une protéine dénommée Las17, homologue de N-WASP. Las 17 est une protéine de 67,7 kDa [Feliciano et Pietro, MBoC 2012]. Elle n'est malheureusement pas très stable et assez fragile à extraire et à conserver.

### Myosines

La première série de protéines recrutées à la membrane comprend des myosines. "Myo3" et "Myo5" sont dites de type I car elle ont une seule tête, ne sont pas processives, et s'associent aux lipides. Elles ont une activité de NPF, et un mutant  $myo3\Delta$  ou  $myo5\Delta$  présente peu de défauts d'endocytose, mais le double mutant présentent d'importants défauts d'endocytose et d'organisation de l'actine [Geli et Riezman, 1996]. Il a été montré que l'activité de NPF mais aussi l'activité moteur de ces myosine est nécessaire pour l'endocytose [Sun et al. 2006].

# Les Protéines de désassemblage

L'assemblage dynamique de réseaux d'actine implique la gestion de l'équilibre entre les quantités d'actine filamenteuse et d'actine G présentes dans la cellule. Les réseaux d'actine, très dynamiques, sont en permanence modifiés, détruits et reconstruits.

La cofiline est une protéine impliquée dans le désassemblage de l'actine. Elle recouvre les filaments, changeant localement le pas de l'hélice. Les interfaces entre monomères recouverts et libres se trouveraient fragilisées par une variation brutale de la rigidité du filament, et seraient ainsi beaucoup plus sujettes à rupture [Hyeran Kang et al. PNAS 2014]. Un co-facteur de la cofiline particulièrement étudié à l'heure actuelle est Aip1. Il a notamment été montré que la cofiline seule ne favorise que peu le désassemblage des filaments, peut causer leur rupture en fragments plus petits, mais que c'est l'ajout d'Aip1 qui déclenche le désassemblage stochastique complet et très rapide ([Gressin et al., Curr. Biol., 2015], [Nadkarni and Brieher, Curr. Biol. 2014]). Aip1 aurait une action de compétition avec la cofiline pour la liaison à l'actine, ce qui permettrait de moduler la concentration de cofiline liée aux filaments [Chen et al., J. Biol. Chem. 2015].

#### Protéines de coiffe

Les protéines de coiffes se lient à l'extrémité barbée des filaments d'actine, bloquant leur croissance. Chez la levure, une seule protéine de coiffe est connue, que nous noterons "CP", en

référence à l'expression anglaise "capping protein". C'est un hétérodimère composé de deux sousunités, Cap1 et Cap2 [Amatruda et al., J. Cell Biol. 1992]. Cap1 et Cap2 sont les homologues de la protéine mammifère CapZ. CP favorise la formation de réseaux d'actine denses en limitant la taille des filaments. Plus la concentration en protéine de coiffe est élevée, plus la fréquence de la nucléation de nouveaux filaments par Arp2/3 augmente [Akin et al. Cell 2008]. Les protéines de coiffe permettent également, en stoppant la croissance des filaments, d'aider à maintenir une base de monomères d'actine disponibles dans la cellule, ou du moins de canaliser l'incorporation d'actine G au niveau d'un nombre limité de bouts barbés. Il est intéressant de noter dès à présent que les protéines ne semblent pas assurer nécessairement une seule fonction. Par exemple, il a été récemment montré qu'en l'absence de CP, Aip1, facteur de dépolymérisation de l'actine, et Abp1/Aim3 semblent capable d'assurer la fonction d'inhiber la croissance des bouts barbés des filaments [Michelot et al. 2013]. Ce type de mécanisme expliquerait que l'absence de CP n'empêche pas la cellule de réaliser l'endocytose [Kaksonen et al., 2005].

### Profiline

Petite protéine très abondante dans les cellules, la profiline se lie à l'actine G activée (ATPactine G). Elle a la particularité d'empêcher l'addition de l'actine G à l'extrémité pointue des filaments tout en l'autorisant à se lier à l'extrémité barbée. Cela favorise une croissance asymétrique des filaments d'actine, qui, si les filaments sont orientés dans la même direction (ce qui est le cas pour une croissance générée par Arp2/3), génère à son tour une orientation forte des réseaux. Par ailleurs, en présence de protéines de coiffe décorant les extrémités barbées des filaments, la profiline agit comme un agent de séquestration et participe ainsi au maintien d'un "pool" d'actine G dans la cellule [Pantoloni and Carlier, Cell 1993]. La profiline empêche aussi toute nucléation spontanée, c'est pourquoi elle est très utilisée dans les protocoles d'expériences *in vitro*.

#### Abp1

Protéine de liaison à l'actine rencontrée dans les patchs d'endocytose, Abp1 joue un rôle dans l'activation du complexe Arp2/3. Elle est également connue pour coiffer les filaments d'actine à leur extrémité barbée. Un mutant n'exprimant pas Abp1 souffre entre autres d'une baisse de sa capacité à réaliser l'endocytose [Saccharomyces Genome Database, dernière consultation 11/10/2016, http://www.yeastgenome.org/locus/S000000684/overview : Burston et al. 2009].

### Protéines de réticulation

Chez la levure, six protéines de réticulation connues : Sac6, Scp1, Abp140, Crn1, et, enfin, la famille des Tef (Tef1 et Tef2) participent à l'agencement des réseaux d'actine des patchs endocytiques [Goode, Eskin, Wendland, 2015]. Différentes études ont montré que ces protéines possèdent des domaines de liaison à l'actine qui leur permettent (théoriquement) de lier deux filaments entre eux. Ces points d'attache peuvent générer des points de réticulation au sein de réseaux branchés, mais aussi aligner des filaments en faisceaux parallèles ou anti-parallèles. Les modalités d'action de ces protéines au sein des patchs endocytiques (structures générées et temporalité) sont encore mal connues. Nous noterons les protéines de réticulation "CL" par la suite à cause de leur nom en anglais "crosslinker".

Sac6, une protéine d'environ 72 kDa, est la plus connue des CL. Elle est présente dans de nombreux réseaux d'actine. Elle présente deux groupes de deux domaines dit "homologues à la calponine", notés domaines CH, de liaison à l'actine (Schéma ??, [Goodman et al., MBoC 2003]). Chacun de ces tandems peut lier l'actine F. Une activité de stabilisation des filaments

d'actine et de réticulation de faisceaux de filaments lui est connue. Il a par exemple été montré que son homologue dans les cellules mammifères, fimbrine, joue un rôle essentiel dans la rigidité du cortex [Ronen Zaidel-Bar, présentation à l'Annual American Biophysical Society Meeting 2016, Plat-965].

Scp1 est une autre CL connue de la levure, beaucoup plus petite (23kDa). Elle est homologue à une protéine de la famille des calponines chez les mammifères, appelée transgelin, connue pour son rôle d'assemblage des filaments d'actine en faisceaux (Schéma ??). Bien que Scp1 possède un domaine CH, il a été montré qu'elle se lie à l'actine F en deux points différents : un domaine "calponin like repeat" et une région riche en proline [Goodman et al., MBoC 2003]. Scp1 semble aider à promouvoir le mouvement d'invagination de la membrane au cours de l'endocytose. Il a été montré que la présence de Calponine sur des filaments d'actine mammifère fait chuter la longueur de persistence de ces filaments de  $8\mu$ m à  $5,8\mu$ m dans [Jensen et al., Cytoskeleton 2012] Ceci montre que non contente de les lier entre eux, cette protéine agit sur la structure même des filaments d'actine (au moins chez les mammifères).

Abp140 est très mal connue : supposée redondante dans sa fonction aux autres CL de l'actine, elle a souvent été laissée de côté dans les études. C'est une assez grosse protéine de 70 kDa, qui peut se lier à l'actine F à la fois dans les patchs endocytiques et sur les câbles d'actine. Elle possède certains domaines en commun avec Sac6.

Crn1, Tef1 et Tef2 ont un rôle encore plus mal défini. Crn1 arrive tardivement dans les patchs endocytiques, et est donc soupçonnée d'avoir une fonction de désassemblage en plus de son rôle de CL. Elle a besoin de former des oligomères pour assurer sa fonction. C'est l'homologue de la coronine chez les mammifères. Tef1 et Tef2 sont connus pour leur rôle dans la formation de fibres de stress, mais leur rôle dans l'endocytose n'a jamais été étudié [Goode, Eskin, Wendland, 2015].

# 2.3.2 La machinerie Arp2/3

Les réseaux d'actine s'assemblent sur les sites d'endocytose suivant les modalités du modèle de nucléation dendritique de l'actine.

Arp2/3 est recruté et activé à la membrane par un NPFs, comme Las17. Une fois activé ce complexe peut se lier à un filament préexistant d'actine et générer la croissance d'une nouvelle branche avec un angle de 70° avec le filament. Cette croissance repousse la membrane au contact de laquelle elle se fait. Des protéines de coiffe mettent rapidement un terme à la croissance afin d'inhiber l'élongation incontrôlée de filaments d'actine se trouvant en dehors de la zone de nucléation, et le filament vieillit progressivement : les monomères qui le constitue hydrolysent leur ATP. Cofiline décore alors les filaments, favorisant la libération des phosphates dans le milieu et la fragmentation à l'extrêmité pointue des filaments. La profiline favorise la transition des monomères de l'état ADP à ATP, ce qui renouvelle le pool de monomères prêts à être incorporés à de nouveaux filaments par Arp2/3. Ces étapes pour les cellules mammifères (les même que chez la levure) apparaissent dans un schéma très clair de **?** non reproduit ici pour des questions de droits d'auteur. Ces réseaux d'actine branchés dynamiques peuvent générer des forces sans l'aide de moteur moléculaires [Borisy and Svitkina, 2000].

# 2.4 Deux approches expérimentales

# 2.4.1 Les Manipulations génétiques : Approche "Top-Down"

Une première approche du système consiste à le considérer dans son ensemble, en utilisant des extraits cellulaires, c'est à dire le broyat des levures dont on a extrait la phase protéique (cytoplasme débarrassé des organites). L'actine et les 90 ABPs sont considérés comme une boîte noire, en ce que la contribution à la mécanique des réseaux d'actine branchés de la plupart des protéines des patchs est inconnue. Des manipulations génétiques permettent alors de retirer des composants de la boîte noire, en créant des mutants "knock-out" pour l'une ou plusieurs de ses protéines. Un mutant KO perd totalement la capacité d'exprimer la protéine choisie. L'étude comparative de ce système avec celui tiré de la souche sauvage permet alors de déduire des propriétés du ou des composants manquants. L'utilisation des screens génétiques exhaustifs chez la levure permet d'identifier tous les composants à tester pour une étude donnée ([Costanzo et al. Science 2010];[Costanzo et al. Science 2016]).

Il est en théorie possible de retirer de la cellule toutes les protéines une à une pour étudier l'effet de leur absence. Cependant certaines sont si importantes que la cellule ne peut pas vivre sans elle, et les mutations touchant ces protéines sont alors léthales. On peut citer bien sûr l'actine elle-même, mais encore la cofiline, principal facteur de dépolymérisation des filaments. Dans de tels cas, il est possible de générer des mutants viables KO pour des co-facteurs (par exemple Aip1 pour cofiline) ou de proches partenaires de ces protéines afin d'étudier de manière indirecte leur rôle. Si l'on ne connait pas les co-facteurs associés, des mutants ponctuels ou thermosensibles permettent de travailler directement sur la protéine d'intérêt.

# 2.4.2 Purification de protéines : "Approche Bottom-Up"

L'approche complémentaire de cette première méthode consiste à utiliser un ensemble de quelques protéines purifiées. Pour le système *S. Cerevisiae*, seules quatre protéines sont nécessaires (neuf en décomposant le complexe protéique Arp2/3), outre l'actine. L'initiateur de la polymérisation, Las17, le complexe de branchement Arp2/3, une protéine de coiffe afin de limiter la taille des filaments. Enfin, l'actine étant incorporée sous sa forme globulaire, de la profiline est également nécessaire à l'équilibre du système (entre pool d'actine globulaire et d'actine filamenteuse). Les deux familles d'ABPs absentes de ce système sont les protéines de réticulation et les protéines de desassemblage de l'actine. L'utilisation de ce système minimal de réseaux branchés par Arp2/3 permet d'y ajouter à loisir des composants. Il est par exemple possible de mesurer l'effet de la concentration d'un type de protéine sur la réponse du système.

# 2.5 Des colloïdes magnétiques pour mesurer la mécanique des gels d'actine

Les mesures mécaniques sur gels d'actine réalisées pour ce travail l'ont été à l'aide du montage expérimental développé par Thomas Pujol au cours de son doctorat avec Olivia du Roure et Julien Heuvingh [Pujol et al., PNAS 2012]. Le principe repose sur l'utilisation de la force dipolaire attractive entre des microparticules magnétiques dansun champ magnétique homogène. Ces colloïdes jouent alors le rôle de microindenteurs permettant de sonder des gels de faibles épaisseurs polymérisés directement autour des particules.

### 2.5.1 Matérieux magnétiques et superparamagnétisme

Les matériaux répondent à la présence d'un champ magnétique externe de manière variable. Ce paramètre de réponse, appelé l'aimantation d'un matériau, dépend de sa susceptibilité magnétique et de l'intensité du champ magnétique de sollicitation. En fonction de la valeur de la susceptibilité magnétique, on peut classer les matériaux dans 3 catégories. Les matériaux ferromagnétiques (fer, mu-metal, cobalt, ...) ont une susceptibilité magnétique élevée, et ils ont la particularité de conserver une aimantation rémanente suite à l'exposition à un champ magnétique externe. Les matériaux diamagnétiques (plomb, or, cuivre, ...) ont une susceptibilité magnétique très faible, mais surtout négative : ils acquièrent une aimantation opposée à celle du champ initial (et faible). Les matériaux paramagnétiques (air, aluminium, platine, ...), enfin, ont une faible susceptibilité magnétique, positive, qui leur permet de générer des champs magnétiques de direction et de sens identiques à ceux du champ "père".

Un matériau superparamagnétique est un matériau avec une forte susceptibilité magnétique mais pas d'aimantation rémanente. D'un point de vue pratique, cette propriété est obtenue par la présence d'un grand nombre de "grains" ferromagnétiques présentant un seul monodomaine au sein d'un matériau. Leur aimantation, dans ces conditions, est considérée être constituée d'un seul spin (en réalité somme de tous les moments magnétiques d'un grain). Nous utilisons dans ce montage des particules colloïdales sphériques Dynabeads de  $4,4\mu$ m de diamètre constituées de nanodomaines de  $Fe_3O_4, \gamma - Fe_2O_3$  emprisonnés dans une matrice de polystyrène. Soumis à un champ magnétique, les moments magnétiques de chaque grains s'alignent avec le champ et s'additionnent alors. Aussitôt la sollicitation interrompue, les moments reprennent une orientation aléatoire et leur somme devient nulle.

Deux billes superparamagnétiques et soumises à un champ magnétique génèrent une interaction dipolaire (attractive dans la direction du champ), et s'alignent spontanément en longues chaînes le long des lignes de champ. Plus ce champ est fort, plus l'attraction entre deux billes voisines est forte. Si ce champ s'interrompt, elles sont suffisamment petites pour que l'agitation thermique du milieu suffise à les disperser.

# 2.5.2 Principe et avantages de la mesure

Le système expérimental mis en place au laboratoire consiste en un microscope sur le plateau duquel sont installées deux bobines permettant de générer un champ magnétique homogène. Il est alors possible d'injecter des billes magnétiques dans une chambre d'observation, où, une fois soumises au champ magnétique, elles s'auto-organisent en chaînes. La force dipolaire générée entre deux voisines au sein d'un chaîne permet de travailler sur une gamme de force allant du pN au nN, soit presque autant qu'un AFM, et beaucoup plus que les système de pièges optiques. Toutes particules de dimensions micrométriques et ayant des propriétés superparamagnétiques peuvent être utilisées dans ce système. Cependant plus leur concentration en domaines super-paramagnétique est importante plus leur capacité à générer une grande force augmente. Des particules avec une forte susceptibilité magnétique et une forte concentration en nanoparticules ferromagnétique comme les dynabeads, associées à des bobines d'un grand nombre de spires et à un générateur de courant puissant permettent d'explorer une grande gamme de forces. Connaissant précisément la relation entre champ magnétique et force ressentie entre deux billes voisines, il est possible de générer une infinité de variantes de formes de sollicitation, de la rampe de force aux sinuoïdes de fréquence variable.

L'utilisation de ce système pour l'étude de réseaux biologiques de polymères est possible en faisant croître les réseaux de biopolymères à tester autour des colloïdes superparmagnétiques. On obtient ainsi des échantillons et des microindenteurs (des billes restées nues) qui s'alignent spontanément dans le champ d'observation. Contrairement aux expériences de micro-rhéologie où des billes sont injectées dans un gel, ici les réseaux à tester sont uniquement présents autour des billes. Le contrôle du champ magnétique nous donne un contrôle de la force avec laquelle une bille déforme le gel qui recouvre sa voisine (et le contrôle de la dépendance temporelle de la



FIGURE 2.2 – Alignement des billes dans un champ magnétique

forme de la sollicitation). De plus, une chaine de colloïdes peut être composée d'un très grand nombre de billes dont chaque interface représente une mesure potentielle. Chaque mesure est non seulement rapide à réaliser, mais également à haut débit (d'une trentaine à plusieurs centaines points de mesure par journée d'expérience selon le système étudié).

Les images sont enregistrés pendant l'expérience via une caméra à haute définition, qui permet de connaître à tout moment la position du centre des billes avec une grande précision (de l'ordre de quelques nanomètres). De plus les billes que nous utilisons sont très monodisperses en taille et en charge de particules, ce qui permet de connaître l'épaisseur des gels et d'estimer facilement l'aimantation. La force appliquée sur une bille est ainsi calculable avec une grande précision. De même, la mesure de la déformation des gels obtenue grâce à la mesure de la distance entre les centres des billes est bien mieux résolue qu'une mesure directe de l'épaisseur des gels sur une image de fluorescence. On obtient finalement des courbe-réponses d'évolution de la distance en fonction de la force appliquée. Le traitement de cette mesure de l'indentation nous livre ensuite des informations sur la croissance des gels, leur module élastique, la part de la composante plastique de la déformation ou encore le retard de réponse du réseau en cas de sollicitation sinusoïdale.

L'expérience comporte donc les multiples avantages de la simplicité de mise en oeuvre, du grand nombre de mesures possibles, et enfin de la précision.

# 2.6 Bilan

Cette thèse est consacrée à l'étude des réseaux d'actine branchés de levure reconstitués *in vitro* autour de billes superparamagnétiques et au rôle des protéines d'architecture de ces réseaux sur leurs propriétés mécaniques. Un choix parmi les 90 protéines impliquées dans la formation des patch endocytique a été nécessaire pour la première étude de ce système.

### 2.6.1 Choix des protéines étudiées

Nous nous sommes intéressés à l'influence des protéines dites "de réticulation" sur le réseau. Parmi les protéines de réticulation détectées dans le système, Sac6, Scp1 ont la particularité d'être les mieux caractérisées à ce jour.

Il est certain que Sac6 possède la capacité de s'attacher à deux filaments d'actine en même temps, et il a été montré que les structures d'ordre supérieur auxquelles elle participe sont nécessaires à la génération de force par les réseaux d'actine branchés des patchs endocytiques [Kaksonen et al., Cell 2005].

Des levures n'exprimant ni Sac6 ni Scp1 sont viables (tandis qu'une double mutation de Sac6 et de Abp1 par exemple est léthale) [Saccharomyces Genome Database]. Pourtant, des

observations phénotypiques ont montré que des levures mutantes privées de Sac6 et Scp1 sont très malades et échouent régulièrement à internaliser des vésicules. Des mutants privés de Sac6 seulement montrent aussi des difficultés à réaliser l'endocytose, tandis que des levures privées de Scp1 parviennent toujours à générer des vésicules endocytiques avec un bon taux de succès. Des phénomènes de sauvetages par surexpression d'une CL en l'absence d'une autre sont attendus, d'autant plus qu'il a été montré que Scp1 et Sac6 coopèrent dans l'organisation des réseaux branchés d'actine [Goodman et al., MBoC 2003; Gheorghe et al. Journal of Biological Chemistry 2008]. Des disparités de fonction entre Sac6 et Scp1 ont ainsi déjà été observées, et réaliser une quantification des conséquences de ces variations sur la mécanique des réseaux est donc intéressante.

Par exemple, Scp1 et Sac6 ayant des domaines de liaison à l'actine différents, la question de l'équilibre chimique  $(k_{on}, k_{off})$  ou encore de la résistance à la contrainte des points de réticulations de l'une ou de l'autre peut se poser.

Abp140, à l'inverse, est peu caractérisé et sans homologue connu chez les mammifères [Goode et al. 2015]. Le phénotype des levures privées de Abp140 est lui aussi inchangé. Par ailleurs ces trois protéines ont la particularité d'avoir très peu d'interactions physiques connues avec d'autres partenaires que l'actine. Scp1 peut intéragir avec Abp1, mais pas Sac6 ni Abp140.

Nous avons choisi de nous concentrer, pour cette étude, sur ces trois protéines de réticulation : Sac6, Scp1, et Abp140. Il est attendu, que la présence de chacune de ces protéines augmente la rigidité du système. Toutefois les différences de structures et d'interaction avec l'actine décrites plus haut peuvent trouver une signature dans la mécanique des réseaux d'actine auxquels elles sont incorporées. Nous mettons en lumière par cette étude une réelle variation dans les effets de chaque protéine de liaison à l'actine.

Crn1, Tef1 et Tef2 ont un rôle encore trop mal défini pour être utilisées ici, dans le cadre d'une étude où la levure sera testée pour la première fois avec le système que nous avons présenté mais pourront être étudiées dans le futur avec l'approche développée au cours de cette thèse.

L'étude de protéines issues des autres grandes familles d'ABPs sera à effectuer dans un second temps (protéines de coiffes, facteurs de dépolymérisation, etc.) afin de dégager, si elles existent, les grandes lignes de contrôle de la mécanique des réseaux par les différentes familles de partenaires de l'actine. Cette thèse a seulement permis d'effectuer quelques mesures préliminaires pour certaines de ces familles.

# 2.6.2 Conclusion

L'utilisation de la levure pour étudier les réseaux branchés d'actine et les partenaires protéiques responsables de leurs architecture et mécanique est particulièrement adaptée car il s'agit d'un organisme modèle simple, dont la plupart des protéines du système que nous souhaitons étudier possèdent leur homologue dans le système mammifère. De plus, le nombre d'homologue pour chaque famille est de plus limité, ce qui rend les résultats assez transposables [Engqvist-Goldstein et Drubin, 2003]. Outre les questionnements d'ordre général sur le fonctionnement des réseaux branchés d'actine, l'étude de l'endocytose médiée par les clathrines représente un enjeu en soi, ce mécanisme étant à l'origine de près de 90% de l'endocytose chez les mammifères. Chez la levure la totalité de l'endocytose se fait par ce mécanisme dépendant des clathrines [Conner et Schimd, Nature review, 2003]. Par ailleurs l'absence d'autres structures d'actine branchée chez la levure offre la possibilité de combiner facilement les observations quantitatives de l'analyse mécanique et biochimique du système à l'observation phénoménologique des phénotypes. Ceci est d'autant plus utile que les propriétés de la levure en ingénierie génétique mettent à notre disposition un vaste panel de mutants pour les ABPs et une variété de combinaisons du système de protéines purifiées encore plus importante. Enfin, le choix de travailler en premier lieu sur les protéines de réticulation se justifie par le fait que l'effet de la réticulation d'un réseau de polymère attendu sur sa mécanique est *a priori* évident. Il l'est aussi par le fait qu'il manque encore actuellement des preuves irréfutables de l'activité de réticulation de ces protéines au sein des réseaux branchés générés par Arp2/3.

Pour finir, aucune de ces études ne serait envisageable sans la puissance du système de mesure mécanique par manipulation des colloïdes superparamagnétiques. Le haut débit nous donne la possibilité de tester de nombreuses conditions tout en restant quantitatif. Même si la variabilité intrinsèque aux échantillons biologiques génère de larges barres erreurs, nous pouvons accumuler suffisamment de points pour dresser des distributions piquées avec une bonne confiance dans la mesure de la moyenne.
# Chapitre 3

# Matériel et Méthodes

DANS ce chapitre seront présentées les caractéristiques techniques du montage expérimental ainsi que les protocoles opératoires. Des techniques d'imagerie en molécule unique et de microfabrication qui ont été ponctuellement utilisées ou développées pendant cette thèse sont elles présentées en Annexes.

La mesure des propriétés mécaniques de gels de polymères à l'aide de billes superparamagnétiques repose sur l'apparition de forces dipolaires entre les billes lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique. Ces forces causent l'auto-organisation des billes en longues chaînes au sein desquelles chaque bille est attirée par ses voisines. Combinée à des méthodes de greffage des surfaces des billes pour y faire croître des réseaux de polymères, cette technique permet de tester la mécanique de n'importe quel gel pouvant pousser autour de ces colloïdes. Cette thèse est consacrée à l'étude de la mécanique des réseaux branchés d'actine de la levure *S. cerevisiae*. Chez la levure, de tels réseaux se forment seulement au niveau des sites d'endocytose. La polymérisation des réseaux depuis la surface des billes est obtenue grâce à la fonctionnalisation des billes par un activateur de Arp2/3, dont la machinerie est nécessaire et suffisante à la croissance des réseaux branchés *in vitro*.

Nous nous intéresserons tout d'abord à la technique des colloïdes magnétiques. Le montage expérimental est présenté, puis les modèles sur lesquels repose la mesure sont discutés. Les critères d'analyse des données sont également présentés brièvement. Nous évoquerons ensuite les différents protocoles de préparation des extraits cellulaires, purification des protéines, et les étapes de reconstitutions des patchs endocytiques *in vitro*.

# 3.1 Méthode des billes magnétiques

# 3.1.1 Setup experimental

Le montage expérimental est composé d'un microscope inversé sur lequel sont installées une caméra rapide et une lampe de fluorescence. Sur la platine deux bobines génèrent un champ magnétique. L'ensemble est contrôlé par ordinateur. Le schéma 3.1 présente le principe de fonctionnement du montage expérimental : les paramètres d'acquisition sont définis par l'utilisateur (forme du champ, type d'image et fréquence d'acquisition) dans un programme Labview qui envoie une commande à la caméra d'une part, et au générateur de courant d'autre part. La tension de consigne du générateur et celle aux bornes des bobines, qui permettent de remonter à la valeur du champ magnétique effectivement généré, est mesurée en continu, et enregistrée quand l'ordinateur reçoit un signal (TTL) de la caméra, à chaque image acquise.



FIGURE 3.1 – Schéma de principe du montage expérimental.

Ce montage expérimental est basé sur celui utilisé pour la thèse <u>Etude mécanique des gels</u> <u>d'actine branchés</u> de mammifère [Pujol, 2012].

# Champ magnétique

Le champ magnétique généré au sein de l'échantillon est homogène grâce à l'utilisation de deux bobines placées de part et d'autre, en configuration pseudo-Helmhotlz. Leurs caractéristiques sont les suivantes : diamètre intérieur 26mm, diamètre extérieur 88mm, longueur 40mm, chacune présentant 750 spires. Un noyau de mu-métal permet de concentrer les lignes de champs et d'augmenter le champ magnétique au dessus de l'objectif. Elles sont alimentées par un vrai générateur de courant appelé BOP (Bipolar Opérational Power supply amplifier) de 6A/36V. A 80% de sa puissance, nous parvenons a générer des champs jusqu'à 80mT. La valeur du champ magnétique généré B est proportionnelle à l'intensité du courant circulant I (d'où la necessité d'une source de courant pour un bon contrôle du champ magnétique dans les bobines).

Il n'est pas possible de se placer dans une vraie configuration de Helmholtz (il faudrait espacer les bobines d'une distance égale à leur diamètre) à cause de l'encombrement de l'objectif du microscope. Un faible gradient de champ existe donc au sein de l'échantillon (0,1mT/cm au maximum), mais la force ainsi générée au maximum du champ est cinq ordres de grandeur plus faible que celle due à l'interaction dipolaire entre colloïdes.

La distance entre les bobines n'étant pas fixée sur le montage expérimental, on étalonne la relation entre le courant parcourant les bobines et le champ magnétique au niveau de l'échantillon avant ou après chaque journée d'expérience.

#### Caractéristiques des colloïdes

Les particules utilisées sont des Dynabeads M450 epoxy (issues de deux lots), billes de  $4,4\mu$ m de diamètre constituées d'une matrice de polystyrène dont les pores sont remplis par des nanoparticules (de l'ordre de 10nm de diamètre) de maghémite (oxyde de fer). La polydispersité en taille des billes au sein d'un échantillon est très faible, mesurée à 0,5% (par Pujol [2012]), et la susceptibilité magnétique des particules a été mesurée en 2005 par [Fonnum et al., 2005], et fité dans la région d'intérêt (0 à 100mT) avec la relation suivante :

$$\chi \cdot B_0 = \frac{(1.991.10^{-3} \cdot B_0^3 + 17.54 \cdot B_0^2 + 153.4 \cdot B_0)}{(B_0^2 + 35.53 \cdot B_0 + 158.1)}$$

qui est utilisée par la suite dans nos programmes de traitement pour remonter à la valeur de la force (avec  $\chi$  la susceptibilité magnétique et  $B_0$  le champ). La figure 3.2 illustre l'évolution de ce coefficient avec le champ magnétique dans cette gamme de champ.



FIGURE 3.2 – La susceptibilité magnétique des dynabeads M450 varie avec le champ magnétique.

L'interaction dipôle-dipôle qui s'établit entre billes donne une force attractive pour deux billes dont les moments sont orientés parallèlement au champ magnétique (angle entre  $[0 \text{ et } 55^{\circ}]$ ) et répulsive sinon. La force diminue avec la distance entre les billes à la puissance 4.

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

Le fait que selon l'angle d'approche une bille est attirée ou repoussée par sa voisine est la raison de l'auto-assemblage des billes sous forme de chaines. La force au sein de la chaine (at-tractive) devient alors :

$$F_{attrac}(0^{\circ}) = \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4}$$
(3.1)

avec  $\mu_0$  la perméabilité du vide, m la norme du moment dipolaire ( $\mathbf{m} = V_{part} \cdot \chi \cdot \mathbf{H}$ ), d la distance entre le centre des particules et  $\theta$  l'angle entre deux billes par rapport aux lignes de champ. Ce calcul se base sur l'hypothèse d'équivalence entre le moment magnétique de la bille et un moment magnétique qui serait ponctuel, en son centre. La validité de cette approximation a été vérifiée précédemment par des calculs en éléments finis [Bauër, 2015], dont le résultat est reproduit sur la figure 3.3.



FIGURE 3.3 - Tracés de la force attractive entre deux billes (de 4µm de diamètre) en fonction de la distance bord à bord; Superposition des courbes de simulation par éléments finis et de calcul avec la formule analytique. La différence entre les deux est inférieure à 3%. Figure tirée du manuscrit de thèse de Pierre Bauër

Les forces ressenties par les billes intègrent les contributions de leurs voisines. Les billes au centre des chaines sentent donc des forces plus importantes que celles aux extrémités. La décroissance en  $d^{-4}$  de la force attractive entre billes est intéressante pour nous car elle nous permet de faire l'approximation qu'une bille est peu influencée par le nombre exacte de ses voisines. Le calcul de la force est réalisé pour une chaîne infinie où toutes les billes se trouveraient à distance égale les unes des autres [Zhang and Widom, 1995] et une correction est appliquée pour les deux interfaces les plus proches de chaque extrémité de la chaîne. Les coefficients de correction pour la force ressentie par des billes de 4,4  $\mu$ m de diamètre sont présentés sur la figure 3.4. Même à l'extrémité de la chaîne, la correction est seulement de 10%, et 2,5% pour les interfaces précédentes. Les équations présentées sur cette figure sont celles utilisées pour le calcul de la force exercée sur une bille dans le programme (Matlab) de traitement des données. Elles sont l'application de la formule 3.1.



FIGURE 3.4 – Correction sur la force pour les billes les plus proches des extrêmités de chaine appliquée dans le programme (Matlab) de traitement des données; Calcul de F d'après la formule 3.1;  $M = \chi \cdot B_0$ .

#### Microscope et imagerie

Toutes les mesures ont été réalisées sur un microscope inversé Zeiss axio A1 dont la platine a été modifiée pour pouvoir porter les deux bobines parallèles encadrant l'échantillon à observer, typiquement de la dimension d'une lame de microscope 7,5x2,5 cm<sup>2</sup>. L'utilisation du maximum de grossissement avec un objectif x100 à immersion d'ouverture numérique 1.4 permet d'obtenir une bonne résolution du centre des billes tout en maintenant un nombre suffisant de billes dans le champ d'observation.

L'acquisition des images se fait en lumière blanche, avec une focalisation au sommet des billes, afin d'enregistrer leur position au cours du temps. L'illumination est réglée de manière à obtenir un maximum d'intensité au centre des billes tout en restant en dessous du seuil de saturation. A la fin d'une mesure, des images de fluorescence sont systématiquement prises avec une focalisation à l'équateur des billes, en utilisant une lampe de fluorescence HXP 120 C (Kübler) et différents filtres Zeiss selon la longueur d'onde. Cette étape seule nous permet de visualiser les gels d'actine et de déterminer ainsi quelles interfaces seront utilisées pour les mesures.

Le champ de la caméra ne représente qu'une fraction du volume de la chambre, mais ce petit volume peut laisser apparaître à l'image des chaînes d'une vingtaine de billes. Comme la force attractive générée entre billes varie en  $\frac{m^2}{d^4}$ , aligner les billes sans déformer les gels qui les entourent nécessite de les laisser s'organiser avec un champ magnétique faible. Afin de permettre la formation de chaines à très faible valeur de champ (de 3 à 18 billes par chaîne) lors d'une expérience il est donc nécessaire d'injecter suffisamment de billes dans le milieu. En effet la distance à laquelle deux billes peuvent se sentir augmente avec le carré du moment dipolaire, mais augmenter l'intensité du champ magnétique signifie également augmenter la force au point de contact entre billes.

#### Caméras et contrôle via Labview

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide de trois caméras interchangeables sur deux montages expérimentaux, une Andor Neo 5.5 sCMOS, une Orca Flash 2.8 et enfin une Orca Flash 4 de Hamamatsu.

Elles sont pilotées par un programme Labview qui contrôle par ailleurs l'envoi des signaux à la BOP (via une carte d'acquisition National Instrument). La carte d'acquisition récupère des signaux de la caméra afin de synchroniser la prise des images et la mesure du champ (cf Schéma 3.1).

Chaque caméra est munie d'un capteur sCMOS. L'acquisition d'image par un capteur sCMOS se fait ligne par ligne, c'est pourquoi la seule restriction à la vitesse d'acquisition est la hauteur de la fenêtre d'acquisition (appelée ROI, region of interest, par la suite). L'Andor est pourvue d'un capteur sCMOS de 2560 x 2160 pixels (taille d'un pixel  $6.5\mu m^2$ ) pouvant être utilisé en 16 bits de niveaux de gris ou bien en 12 bits. L'utilisation d'un ROI de 2560x250 px nous permet d'utiliser une fréquence de 33Hz pour 15,15s d'acquisition. La qualité des images obtenues est très bonne mais la caméra s'est avérée très difficile à programmer (problème de stabilité du programme constructeur pour la récupération des images enregistrées). Une caméra différente a donc été installée sur le second montage : une Orca Flash 2.8 (12 bits), qui dispose elle d'un sCMOS de 1920 x 1940 px (taille d'un pixel  $3.63\mu m^2$ ). La qualité des images acquise avec cette caméra est légèrement inférieure et la taille du champ est nettement plus petite (à cause de la taille de ses pixels), mais sa versatilité en termes de programmation compensaient ce défaut. L'achat d'une Orca Flash 4 combinant les qualités des deux autres caméras a changé la donne définitivement. Cette dernière caméra dispose d'un capteur sCMOS de 2048 x 2048 pixels (taille d'un pixel  $6.5\mu$ m<sup>2</sup>). Elle est couplée à une baie de quatre disques durs SSD permettant un acquisition rapide. Une acquisition à 33Hz se réalise sans problème sur l'intégralité du capteur sur des durées supérieures à la minute tandis qu'il est par exemple possible d'acquérir plus de 2500 images à 333Hz avec un ROI de 2048 x 600px.

Avec l'objectif x100 du microscope, on obtient un grossissement final de 1px = 63,3 nm pour la caméra Neo de Andor et la Orca Flash 4 de Hamamatsu, et 1px = 35,3 nm pour la Orca Flash 2.8 de Hamamatsu. L'illumination (lumière blanche) est contrôlée de manière à graduer l'image sur la plus grande gamme de niveaux de gris possible afin d'augmenter le rapport signal sur bruit, mais sans atteindre la saturation qui entraînerait une perte de précision sur la position du centre des billes.

Les caméras Orca Flash acquierent les données dans un format propriétaire, .dcimg, qu'il faut ensuite convertir en un format libre tel que le .tif. Un programme Labview nous permet de réaliser cette opération tout en extrayant des données utiles des séquences d'images telles que l'heure précise de leur enregistrement à l'horloge de l'ordinateur. Ces données serviront à effectuer des contrôles de validité de nos données, par exemple sur la fréquence réelle d'acquisition des images.

# Traitement d'image

#### Distance entre particules

Les séquences d'images au format .tif sont d'abord traitées via le logiciel libre ImageJ. Une première étape consiste à détecter et sélectionner les centres des billes par un seuillage des niveaux de gris. Chaque centre de bille apparait très blanc, et le reste de l'objet noir (minimum d'intensité). Puis la position de chaque centre de masse est détectée en pondérant la position de chaque pixel sélectionné par son niveau de gris, et ce, sur chaque image. La précision de cette mesure de la distance est de l'ordre de quelques nanomètres, grâce au bon contraste entre les niveaux de gris donné par l'acquisition en 16 bit notamment. La camera Orca flash 2.8 par exemple, bien que n'acquérant que des images en 12 bits, possède de très petits pixels qui compensent cette faiblesse et permettent de maintenir la précision sur la distance. En cas de mauvais réglage de l'illumination lors de l'étape de microscopie en revanche, la mesure de position des billes sera très bruité.

## Mesure de la fluorescence

Le niveau de fluorescence des gels peut être estimé par la mesure, par bille, de l'intensité moyenne I sur un rectangle positionné sur l'image de fluorescence de manière à ne pas passer par la zone de contact entre une bille et sa voisine. A cette mesure est retranché le niveau de fluorescence du fond de l'image, évalué de la même manière. Le fluorophore étant lié à une protéine partenaire de l'actine ou à l'actine elle-même, sa concentration et donc l'intensité lumineuse reflète celle de l'actine dans les gels.

#### 3.1.2 Analyse

Les données obtenues sont ensuite analysées via des programmes Matlab. L'évolution de la distance entre les colloïdes en fonction de la force attractive entre les particules est calculée puis utilisée pour accéder à différentes grandeurs. La variation de l'épaisseur des gels est suivie particulièrement finement, par rapport à d'autres techniques recourant à une mesure directe sur des gels fluorescents, grâce à la combinaison de la mesure précise du déplacement des billes et la monodispersité de tailles de celles-ci. La multiplication des conditions expérimentales : changement de fréquence d'acquisition, de forme de sollicitation, ou tout simplement de durée de polymérisation des gels, nous a poussé à extraire et sauvegarder le plus d'informations possible au sein d'une matrice unique (ci-après appelée MRC), afin de pouvoir effectuer de nombreuse étapes de contrôle de la qualité des mesures et trier les résultats en fonction des différentes conditions d'expérience. Dans ce paragraphe nous nous pencherons sur les différentes étapes de ce traitement.

#### Modèle de Hertz pour l'estimation du module élastique

Pour un matériau isotrope dans son régime de déformation linéraire, la loi de Hooke établit une relation entre contrainte  $\sigma$ , déformation  $\epsilon$  et module élastique d'un matériau E :

$$\sigma = E \cdot \epsilon \tag{3.2}$$

Le modèle de Hertz (Hertz, 1881) permet l'extraction des informations sur l'élasticité des réseaux à partir des courbes force-distance dans le cas d'un contact entre deux sphères élastiques. En effet dans cette géométrie la surface de contact entre les deux particules évolue avec l'identation. De même, la contrainte appliquée au sein du matériau sollicité est inhomogène (parabolique dans le plan de la surface de contact ; maximale au point de contact et tendant vers zéro lorsque l'on s'enfonce dans le matériau sollicité ; [Johnson, 1985]).

La force appliquée sur ce type d'interface peut être estimée à l'aide de la relation suivante :

$$F = \frac{4}{3}E \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \cdot R^{\frac{1}{2}}$$
(3.3)

Avec E le module de Young,  $\delta$  l'indentation et R un rayon de courbure. Notons ici que la force donnée par cette équation est la force de déformation élastique au contact entre les sphères, or nous connaissons la force magnétique d'attraction entre deux billes dans notre système. On considère que le système est à l'équilibre et que la force élastique qui résiste à la déformation compense la force magnétique. Leur normes sont donc égales :

# $F_{\text{élastique}} = F_{\text{magnétique}}$

Connaissant  $F_{\text{magnétique}}$ , R et  $\delta$ , on peut déduire E.

Il est possible de réaliser un calcul en ordre de grandeur pour arriver à la relation 3.3. On se place dans le cas d'un contact sphère-gel plan, où la sphère a pour rayon  $R_{eq} = \frac{1}{\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}}$ , analogue à un contact sphère-sphère entre deux billes de rayon  $R_1$  et  $R_2$  respectivement. a est le rayon de l'aire de contact.

On voit sur le schéma d'interaction sphère-plan de la figure 3.5 que d'après Pythagore on peut écrire :



FIGURE 3.5 - Définition des grandeurs apparaissant dans le modèle de Hertz :  $R_{bille}$ le rayon de la sphère, a le rayon de l'aire de contact,  $\delta$  l'indentation maximale dans le gel entourant la seconde bille,  $R_{eq}$  le rayon de la sphère dans une géométrie sphère-plan équivalente à la géométrie sphère-sphère.

$$R_{eq}^2 = a^2 + (R_{eq} - \delta)^2$$
$$R_{eq}^2 = a^2 + R_{eq}^2 - 2R_{eq}\delta + \delta^2$$
$$\left(\frac{a}{R_{eq}}\right)^2 = 2\frac{\delta}{R_{eq}} - \left(\frac{\delta}{R_{eq}}\right)^2$$

Si  $R_{eq} \gg \delta$ , on peut négliger le terme du deuxième ordre  $(\frac{\delta}{R_{eq}})^2$  et obtenir la relation suivante :

$$a = \sqrt{R_{eq}\delta} \tag{3.4}$$

La contrainte peut s'écrire comme la force F, divisée par l'aire de contact  $a^2$ . Pour exprimer la déformation en fonction des autres paramètres, il nous faut estimer la taille de la zone qui subit une déformation. L'hypothèse de Hertz est que cette zone a pour taille caractéristique a, le rayon de la zone de contact. La déformation s'écrit donc comme l'indentation delta divisé par a. La loi de Hooke (équation 3.2) devient :

$$\frac{F}{a^2} = E \cdot \frac{\delta}{a}$$

Soit :

 $F\sim E\delta a$ 

En reprenant l'équation 3.4 on obtient alors :

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

Ce modèle a été développé pour l'interaction d'une sphère avec un plan d'épaisseur infinie. On peut l'utiliser dans une géométrie sphère-sphère en calculant le rayon équivalent comme présenté sur la figure 3.5. Le modèle est valide pour des taille de zone de contact, a, bien inférieure au rayon de la bille élastique. Or ici, seule l'épaisseur du gel d'actine, de taille à peu près comparable à la zone de contact, est élastique. La présence d'une sphère rigide en dessous du gel d'actine va entrainer une surestimation importante du module élastique du gel.

#### Correction de Dimitriadis pour les matériaux d'épaisseur finie

L'utilisation du modèle de Hertz pour le système n'est donc possible qu'en y appliquant une correction relative à l'épaisseur finie des gels. Cette correction proposée en 2002 pour les mesures de mécaniques de couches minces par microscopie à force atomique [Dimitriadis et al., Biophysical Journal 2002] donne à la relation entre F, E et  $\delta$  l'allure suivante :

$$F \sim \frac{4E}{3(1-\nu^2)} R^{\frac{1}{2}} \delta^{\frac{3}{2}} \left[ 1 - \frac{2\alpha_0}{\pi} \chi_m + \frac{4\alpha_0^2}{\pi^2} \chi_m^2 - \frac{8}{\pi^3} \left( \alpha_0^3 + \frac{4\pi^2}{15} \beta_0 \right) \chi_m^3 + \frac{16\alpha_0}{\pi^4} \left( \alpha_0^3 + \frac{3\pi^2}{5} \beta_0 \right) \chi_m^4 \right]$$
(3.5)

Avec

$$\chi_m = \frac{\sqrt{R\delta}}{h}$$

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

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

Où  $\nu$  est le module de Poisson, supposé égal à 0,5. C'est cette relation polynomiale, 3.5, qui est utilisée pour extraire le module élastique d'un fit de nos courbes force-distance pour chaque gel.

La figure 5 de Dimitriadis et al. [2002] (non reproduite ici pour des questions de droits d'auteur) compare le modèle de Hertz corrigé et des valeurs expérimentales. La courbe correspondant à l'équation 3.5 ci-dessus fit parfaitement les données expérimentales jusqu'à leur valeur extrême, pour  $\chi_m = 2$ , et ne rejoint pas un second fit, représentant une autre théorie ([Chadwick, 2002]), avant des valeurs de l'ordre de  $\chi_m \approx 3, 5$ .

#### Motifs des sollicitations mécaniques et paramètres associés

Je vais rapidement présenter les principaux types de sollicitations qui ont été utilisés durant cette thèse.





#### Rampe de force

La rampe de force permet d'obtenir des courbes force-distance sur lesquelles un fit donne accès au module de Young comme décrit précédemment. Sur ces mêmes courbes est évaluée une composante plastique du matériau par mesure de l'hystérèse entre la courbe aller et la courbe retour. La figure 3.7 présente un exemple de mesure de rampe de force. L'aire (jaune) est calculée de la manière suivante :

# Aire sous la courbe de charge - Aire sous la courbe de décharge Aire sous la courbe de charge

où la division par l'aire sous la courbe de charge permet de placer la valeur de l'hystérèse entre 0 et 1. Si la courbe retour se superpose à celle de l'aller parfaitement, l'hystérèse relevée est nulle. Si en revanche la distance ne varie pas du tout lorsque l'on relâche la force, alors l'hystérèse vaut 1 (déformation 100% plastique). Ce calcul d'aire est réalisé sous matlab.

D'un point de vue pratique, le calcul de l'hystérèse nécessite plusieurs opérations. La première étape consiste à éliminer tous les points des courbes force-distance en dessous d'un seuil à basse force. Ce seuil a été déterminé de manière à éviter des artefacts dus à l'acquisition prolongée à basse force (mais non nulle, donc générant une aire sous la courbe) avant et après la rampe, et est le même pour la totalité des acquisitions traitées. Les courbes sont ensuite lissées sur des séries de 10 points, puis l'aire est estimée comme la somme de la force moyenne atteinte entre deux points consécutifs de distance multipliée par la variation de distance.



FIGURE 3.7 – Les étapes de la mesure pour une rampe de force : envoi d'une forme de champ magnétique faisant naître une force dipolaire, et extraction de la courbe force-distance. En bleu les courbes de compression, en rouge de décompression. Figure de droite : les points correspondent aux mesures, les courbes lisses aux fit ; l'aire jaune correspond à l'hystérèse mesurée.

Le choix du mode de quantification de la plasticité observée sur les courbes « retour » des rampes de force est arbitraire. Toutefois, des calculs alternatifs ont été réalisés en prenant par exemple le ratio de la hauteur initiale des gels et de leur épaisseur finale ou encore le ratio du module élastique mesuré en compression sur un module élastique apparent mesuré sur la décompression. Ces résultats, comparés entre eux pour tous les types d'extraits cellulaires, ont donné les mêmes tendances, c'est pourquoi nous avons considéré notre méthodologie comme valide.

Un critère très important de validité du calcul du module d'Young par le modèle de Hertz est la connaissance de l'aire de contact à l'interface à tout moment. Cependant les gels d'actine formés à partir d'extrait de levure étant très plastiques, dès la fin de la première compression nous n'avons plus aucun moyen de connaître la forme de la surface de contact avec la bille voisine, car ils ne suivent pas la même courbe de déformation qu'à l'aller et ne reviennent pas non plus à leur position initiale. Comme le champ magnétique s'applique partout dans la chambre d'observation, nous n'avons d'autre choix que de changer d'échantillon à chaque mesure.

De même, certaines courbes présentent une forme de décrochage au début de la rampe de force (peut-être due à une légère adhésion des billes aux parois de la chambre) qui perturbe le tracé du fit (figure 3.7, courbe force-indentation à droite) : la hauteur initiale des gels ainsi estimée peut s'éloigner fortement de la hauteur initiale réelle. Ce phénomène n'a lieu que lors de la première sollicitation d'un gel mais il n'est pas possible de l'éviter, toujours à cause de la forte déformation plastique qui rend impossible la multiplication des mesures sur un même échantillon. Afin de limiter les biais induits par ces cas de figures, le fit est contraint à passer par un point autour de la hauteur initiale réelle du gel plus ou moins 20 nm au minimum de force.

#### Sinusoides

L'étude de la réponse en fréquence a généralement pour but de séparer les composantes de la réponse élastique et visqueuse d'un système. En effet, le déphasage et l'amplitude de la réponse du gel à une sollicitation sinusoïdale sont liés aux modules de conservation, G' (sollicitation en cisaillement) ou E' (expériences de traction ou compression) et de perte G" ou E" d'un matériau. Intéressons nous pour notre part au module de Young, dans le cas de sollicitations de faibles amplitudes, à une fréquence  $\omega$ . La loi de Hooke devient :

$$\sigma(t) = E^* \varepsilon(t)$$

où  $\sigma(t)$  est la contrainte dynamique appliquée,  $\varepsilon(t)$  la déformation dynamique, et E<sup>\*</sup> le module de Young complexe se décomposant en  $E^* = E' + iE''$ . Contrainte et déformation peuvent s'écrire, sous leur forme complexe :

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{i\omega t}$$
$$\varepsilon(t) = \varepsilon_0 e^{i(\omega t + \delta)}$$

avec  $\sigma_0$  l'amplitude de la contrainte et  $\varepsilon_0$  l'amplitude de la déformation. Le déphasage du signal de réponse  $\delta$  tient compte de la perte d'énergie lors de la déformation du système. Le module de Young complexe peut alors s'écrire :

$$\boldsymbol{E}^{*} = \boldsymbol{E}' + i\boldsymbol{E}'' = \frac{\sigma_{0}}{\varepsilon_{0}}.\boldsymbol{e}^{i\delta}$$

Si l'on sépare les parties imaginaires et complexe de cette équation, on obtient une relation directe et individuelle entre les paramètres observables de l'expérience,  $\sigma_0, \varepsilon_0$  et  $\delta$  et les modules de conservation et de perte.

$$E' = |E^*|cos(\delta) = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0}.cos(\delta)$$
$$E'' = |E^*|sin(\delta) = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0}.sin(\delta)$$

De nombreuses études se servent de ces paramètres pour étudier le cytosquelette in vitro (entre autres par des expériences de microrhéologie) ([Koenderink et al., 2009],[Lieleg et al., 2011]). Ces travaux cherchent notamment à quantifier la part active (présence ou absence de moteurs par exemple, ou encore de processus consommant de l'ATP en général) de la réponse d'un système de polymères biologiques. Dans notre cas, nous avons accès au ratio de la contribution visqueuse sur la contribution plastique :

$$\frac{E''}{E'} = \tan(\delta)$$

Plusieurs séries de mesures à base de sollicitations sinusoïdales nous ont permis d'établir une dépendance en fréquence de la réponse nos gels, et de montrer des variations de la signature mécanique d'un système à l'autre. Néanmoins l'information sur la surface de contact étant perdue dès la fin de la première compression à cause de la déformation résiduelle des réseaux (effet de la plasticité), il nous est impossible de connaître à tout moment l'amplitude de la réponse du système, et donc de dé-corréler E' et E".



FIGURE 3.8 – Contrainte et déformation sinusoïdale : définition du retard  $\delta$ . La contrainte appliquée est représentée en bleue, le signal de réponse mesuré en rouge.  $\delta$  est extrait en utilisant une transformée de fourrier des signaux.

## Limites de validité du calcul du module d'Young

Le calcul de la relation entre F, E et  $\delta$  établie plus haut requiert plusieurs hypothèses : homogénéité et isotropie du matériau testé, et faible indentation.

Un rapide calcul à l'aide de la relation  $a = \sqrt{R_{eq}\delta}$  pour une épaisseur de gel de  $0.5\mu$ m et une indentation de  $0.1\mu$ m donne un rayon de contact caractéristique de l'ordre de 350 nm, soit environ 7 fois la taille caractéristique de la maille réseau branché (cas typique des expériences sur gels reconstitués à partir de protéines purifiées de mammifère). Chaque mesure des propriétés mécaniques d'un gel est donc une moyenne sur plusieurs mailles. Même en reprenant le calcul ci-dessus dans le cas extrême d'une indentation de 50 nm dans un gel d'épaisseur 100 nm, on obtient un rayon caractéristique de 240 nm, soit toujours environ 5 fois la taille de maille. On considère donc que les éventuelles inhomogénéités au niveau du maillage des gels sont moyennées par la mesure.

Si les gels sont très mous, on risque de se trouver dans le cas où l'indentation  $\delta$  est du même ordre de grandeur voire plus importante que le rayon de contact a. Dans sa thèse, T. Pujol utilise un critère pour limiter la taille caractéristique de la zone de contact à une certaine valeur, à quoi venait s'ajouter une restriction sur la correction de Dimitriadis appliquée au cas général :  $\chi_m < 1$ . Ces deux critères, présentés plus en détail en Annexe 8.4., créent cependant un biais sur nos mesures, en écartant systématiquement les courbes les plus molles. Nous avons donc dû définir de nouveaux critères plus adaptés à la grande gamme de modules étudiés ici, qui valident le modèle de Hertz et l'utilisation de gels très fins tout en respectant la contrainte limite de la correction de Dimitriadis. Les gels que nous avons étudiés présentent des valeurs de  $\chi_m$  inférieures à 2 (y compris les gels d'épaisseur très faible comme 100 nm), soit  $\frac{R\delta}{h^2} < 4$ , ce qui permet d'appliquer la correction de Dimitriadis telle que définie précédemment (Figure ??).

#### Critères de sélection des courbes de résultats

Le coefficient de détermination  $R^2$  de la fonction de fit par le modèle de Herz corrigé (codée sous Matlab), combiné à des conditions sur la hauteur initiale de gel calculée, nous permet d'éliminer les courbes problématiques. Nous avons fixé la borne de  $R^2$  à 0,9 et nous fittons sur une grande fenêtre de valeurs de force. Dans sa version finale, notre algorithme lisse la courbe sur 10 points pour le calcul de  $R^2$  afin d'éviter que des courbes avec du bruit (notamment à petites forces) soient ignorées.

L'Annexe 8.4 détaille la comparaison que nous avons effectuée entre les critères utilisés ici et ceux développés auparavant (équations 8.1 et 8.2).

En résumé, la validité d'une courbe pour la mesure du module élastique est déterminée par les critères suivants : un  $R^2 > 0, 9$ , une hauteur initiale des gels supérieure à 100 nm. A ces deux critères s'ajoute une contrainte sur la force maximale atteinte sur les courbes. En effet, la force maximale correspond à la valeur maximale du champ B (80 mT), mais comme la force dépend de la distance entre les billes la force maximale varie avec l'épaisseur et le module d'Young des gels. Une dernière obligation est liée au fait que les gels ont une réponse non linéaire, même si celle-ci est cachée par la forme de la réponse sur un contact de Hertz : il est important de comparer des mesures issus de fit montés à la même force (en général 1 pN). Les courbes des gels répondant à tous les critères peuvent ensuite être utilisées pour étudier d'autres paramètres tels que la déformation résiduelle ou encore le rapport de module d'Young apparents calculé pour la courbe de charge et de décharge, etc. Pour la mesure de l'hystérèse, un critère sur l'indentation du gel est ajouté : on ne sélectionne que les mesures pour lesquelles une indentation d'au moins 30 nm a été atteinte.

#### Statistiques

Les réseaux de polymères biologiques ont une certaine variabilité (distribution statistique des protéines qui les façonnent). Il est ainsi absolument nécessaire de faire appel à des outils statistiques afin de déterminer, pour chaque paramètre étudié, une caractéristique moyenne associée à une certaine largeur de distribution.

Pour les raisons décrites ci-dessus, plus de 2500 gels ont été testés et analysés au cours de cette thèse. Nous nous efforçons d'obtenir, pour chaque paramètre testé, entre 30 et 150 points de mesure valides en au moins 3 expériences indépendantes réalisées sur des journées différentes. La grande quantité de données que nous sommes appelés à manipuler, et régulièrement à posttraiter, nous oblige à les stocker sous forme assez brute dans des structures à la fois facilement accessibles à des programmes de traitement et pouvant également contenir toutes les informations secondaires spécifiques à chaque set de données. Les MRCs que nous construisons sous Matlab sont des cellules contenant des structures où peuvent être stockées des matrices (champ magnétique, force, distance entre les billes, etc.) comme des chaînes de caractères ou encore des nombres (numéro de l'acquisition, ...) dans des champs dédiés. Chaque structure peut contenir un nombre de champs différent de celui de la structure de la cellule voisine. L'accès à ses informations requiert seulement l'utilisation de boucles for, plus lentes que des calculs matriciels. L'utilisation de ces MRCs permet d'effectuer une multitude d'analyses systématiques sur la multitude de points expérimentaux dont nous disposons.

#### Forme des distributions

Parmi les tests statistiques utilisés, un test de  $\chi^2$  (codé sous Matlab) nous a permis de vérifier que les distributions des valeurs du module de Young obtenues dans notre système peuvent être des distributions lognormales. Le principe de ce test (pour une distribution lognormale) est de comparer la distribution des mesures à une distribution lognormale de paramètres  $\mu$  et  $\sigma$ estimés par un fit réalisé sur les données. On divise ensuite l'aire sous la courbe de la distribution lognormale estimée en classes de valeurs équiprobables auxquelles on compare aux effectifs réels obtenus. Si la p-valeur issue de cette comparaison est inférieure à 0,05, alors on peut rejeter l'hyspothèse d'égalité des distributions avec 95% de certitude.

Afin de comparer entre elles les distributions obtenues pour nos différents paramètres et différents essais, nous avons par la suite fait directement appel aux programmes de calcul statistique disponibles sur le site de l'université Pierre et Marie Curie, BiostaTGV (http://marne.u707. jussieu.fr/biostatgv/), qui effectue les calculs sous R. Un test de Student (t-test) nous a permis de juger de la significativité des écarts entre les moyennes de nos distributions.

# 3.2 Préparation des échantillons biologiques

# 3.2.1 Extraits cellulaires

Les processus de modification et culture des mutants de la levure sont réalisés selon un protocole qu'Alphée Michelot a établi ([Michelot and Drubin, 2014]). Les extraits nous parviennent ensuite sous forme de poudre conservée à -80 ° C que nous re-solubilisons pour l'étape finale de préparation. De même, les protéines de levures purifiées que nous utilisons, actine, actine marquée par un fluorophore Alexa 568, Sac6, Scp1, Profiline, Arp2/3 et protéines de coiffe (CP), sont produites et purifiées au sein de la même équipe par Audrey Guillotin.

#### Culture des levures, extraction et stockage

# Croisements

Pour obtenir les mutants, les levures sont transformées avec un plasmide portant le gène à intégrer au génome. L'intégration du gène se fait ensuite par recombinaison homologue de l'ADN double brin.

Pour croiser deux souches mutantes (mutation A et B), on utilise le fait que la levure est un organisme haploïde, c'est à dire porteur d'un seul exemplaire de ses chromosomes. La mutation doit être couplée avec une incapacité à produire un gène de résistance (auxotrophie ou antibiotique) différente pour la lignée A et la lignée B. Les lignées de levures sont d'abord cultivées sur boîte de pétri rempli d'un milieu nutritif riche à 30°C pendant 3 à 4 jours. Puis des cellules prélevées dans les deux colonies sont mélangées sur une nouvelle boite de pétri avec milieu riche. Les levures vont spontanément réaliser des fécondations les rendant diploïdes. Après croissance à 30°C, des cellules sont prélevées déposée sur un milieu pauvre en composés azoté où elle vont sporuler, redevenant ainsi haploïdes. Des analyses par tétrades (étude des 4 spores issues d'une cellule qui donne des information sur les interactions entre les mutations) lors de la sélection. Seule les cellules porteuses des deux mutations pourront se développer.

# Culture et récolte

Les cellules sélectionnées sont ensuite placées en milieu liquide afin de pouvoir en obtenir de grandes quantités (volumes de milieu de l'ordre de 4 à 8L par culture).Ces cultures sont arrêtées en phase exponentielle de croissance (la turbidité du milieu sert de marqueur de la croissance). Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation et immédiatement congelées instantanément dans de l'azote liquide. Pour finir elles sont broyées de façon à détruire les parois cellulaires et les membranes et libérer le contenu des levures. La poudre obtenue est finalement versée dans des tubes falcon 50mL préalablement refroidis à l'azote liquide (de même que l'entonnoir) et immédiatement replacées au congélateur à -80°C pour conservation.

#### Séparation des éléments cellulaires

Afin de reconstituer des gels d'actines à partir d'extraits cellulaires, il faut effectuer deux opérations : préparer les surfaces fonctionnalisées avec l'activateur de la polymérisation (étape décrite dans la partie 3.2.3) et extraire les protéines du broyat cellulaire de levure contenant fragments de membrane, noyau, organites, etc. Cette étape de préparation doit être exécutée rapidement. La solution peut être utilisée pendant environ 4h-4h30 après sa sortie du congélateur.

1g de poudre de levure est pesé rapidement et conservé sur glace afin que sa température remonte lentement à 0°C.  $120\mu L$  de tampon y sont ajoutés, suivant la composition suivante : 4 à  $5\mu L$  d'inhibiteur des protéases afin de préserver le plus longtemps possible les protéines (Protease Inhibitor Cocktail Set IV de CALBIOCHEM, Merck Millipore) dilué dans  $40\mu L$  de tampon sans sel constitué de 100mM d'Hepes à pH 7,5 et  $80\mu$ L de tampon riche en sel (Hepes à 100mM, pH 7,5, KCl à 750mM). Le premier tampon aide à solubiliser les inhibiteurs de protéase, qui précipiteraient dans un environnement salé, tandis que le second permet de maintenir un environnement très riche en sel proche de l'état normal de la cellule (la salinité du milieu est une question importante pour la polymérisation de l'actine). Une fois le mélange fondu, il est placé à l'aide d'une pipette dans un tube pour ultracentrifugeuse (Beckman Coulter Centrifuge Tubes 11x34mm, en silicone-polyallomère car ce dernier est réputé pour ne pas trop capturer de protéines sur ses parois : pas plus de 15% de perte). Les tubes sont disposés dans un rotor MLA-130, préalablement refroidi à 4°C. La solution est centrifugée 25 minutes à 75000 RPM. Ce traitement permet de séparer la phase de déchets les plus gros (organites, ADN, etc., mais aussi l'actine déjà polymérisée) au fond du tube, la phase des lipides membranaires qui flotte au dessus, et la phase protéique au milieu. C'est cette dernière que l'on prélève en prenant garde à ne pas s'approcher des deux autres phases ni à les remélanger en aspirant trop fort avec la pipette. Le volume final de la solution de travail se situe en général entre 200 et 350  $\mu$ L. Cette solution est conservée sur glace tout au long de l'expérience afin de limiter le vieillissement des protéines autant que pour empêcher la polymérisation de l'actine G en solution.

# 3.2.2 Les protéines purifiées

Deux techniques sont disponibles pour produire les protéines purifiées de levure nécessaires à la reconstitution de réseaux branchés d'actine in vitro. Il s'agit de les faire surexprimer soit par la levure (méthode la plus sûre, mais de grandes quantités ne peuvent pas toujours être atteintes), soit par des bactéries (qui offrent un bien meilleur rendement, mais l'activité de la protéine obtenue est à vérifier soigneusement). Alphée Michelot et Audrey Guillotin ont réussi à établir plusieurs protocoles de production des protéines nécessaires aux expériences de cette thèse notamment pour la Las17. Les expériences qui sont présentées dans ce manuscrit ont donc été réalisées tantôt avec un activateur de la polymérisation de levure produit par la levure, tantôt par des bactéries.

#### Transformation avec plasmide d'expression en levure

La première étape consiste ici aussi à faire croître des levure sur boîte de pétri. Pour s'assurer de distinguer les levures qui auront absorbé le plasmide et exprimé son contenu, on travaille là encore avec des lignées auxotrophes qui portent aussi des mutations sur quelques protéases pour éviter la dégradation des protéines après lyse. Par exemple, on peut utiliser des levures incapables de produire leur propre uracile, une base de l'ARN.

La transformation est l'étape au cours de laquelle un plasmide "high-copy" portant le gène de la protéine que l'on souhaite voir exprimée sous promoteur GAL, associé à un tag afin de pouvoir extraire cette même protéine par la suite, et, par ailleurs portant l'information génétique nécessaire à la production du composé manquant. La transformation se fait par mélange des levures avec la solution contenant plasmides et réactif puis choc thermique pour fragiliser les membranes cellulaires et les rendre poreuses.

Les levures sont centrifugées et étalées sur une boîte de pétri contenant un milieu sans uracile afin de sélectionner uniquement les cellules ayant incorporé le plasmide (3 à 4 jours à 25°C).

Les cellules sont ensuite placées en milieu liquide afin de pouvoir obtenir de grandes quantités (volumes de milieu de l'ordre de 4 à 8L par culture). Dans un premier temps, le milieu est dépourvu d'uracile afin de conserver la sélection, puis dans une seconde phase finale permettant de promouvoir la production de protéines, les cellules sont placées dans un milieu dont on a changé les sucres. Cette dernière phase se nomme l'induction. La turbidité du milieu sert de marqueur de croissance et cette fois on attend d'atteindre le plateau qui suit la phase exponentielle de croissance afin de disposer d'assez de cellules. Les cellules sont alors récupérées, broyées comme expliqué précédemment, la phase protéique est récupérée et passée sur une colonne de purification afin de récupérer la protéine d'intérêt.

#### Les contrôles : Western Blot, nanodrop et test de motilité

Un test SDS-page, électrophorèse sur un gel de polyacrylamide suivi de la détection des protéines avec du bleu de comassie permet de vérifier la pureté de la solution finale obtenue (pas de protéine non voulue, pas trop de fragments de protéine dégradée). La concentration finale de protéines est ensuite estimée soit sur le gel soit par spectrométrie comme lors de la culture des cellules en milieu liquide, mais cette fois avec une machine optimisée pour n'utiliser que de très petits volumes, le NanoDrop.

A. Guillotin a réussi à déterminer les concentrations natives, chez la levure, de l'actine, Arp2/3, la protéine de coiffe, et certaines protéines de réticulation. Les concentrations de Sac6 et Scp1, faibles, ont été très difficiles à déterminer. [Sac6] a montré de très fortes variations d'une mesure à l'autre (simple au double), tandis que [Scp1] n'a pas encore pu être estimée. Les valeurs obtenues sont les suivantes : actine de 1 à  $2\mu$ M, Arp2/3 de 10 à 25nM, CP à 400nM, Sac6 autour de 25nM.

Nous allons simplement présenter ici le protocole de reconstitution des gels in vitro dans les conditions utilisées pour les expériences de cette thèse.

# 3.2.3 Reconstitution in vitro

Nous travaillons à la fois avec des extraits cellulaires - c'est à dire des levures broyées dont l'intégralité des protéines sont ensuite extraites -, à la fois avec des jeux de protéines de levure purifiées à concentrations équivalentes.

#### Fonctionalisation des billes

Afin d'obtenir des gels branchés autour des colloïdes superparamagnétiques, la première étape consiste à les fonctionnaliser avec une protéine recrutant la protéine de branchement Arp2/3 : pour la levure, Las17. La protéine Las17 purifiée, une fois sortie du congélateur de stockage à -80°C et placée sur glace, conserve son activité un peu moins d'une journée. Afin de travailler dans des conditions d'activité optimale pour toutes les protéines, il est recommandé de préparer les colloïdes fonctionnalisés en même temps que les extraits cellulaires.

Les billes Dynabeads M450 epoxy sont lavées plusieurs fois pour ôter toute trace de surfactant à l'aide du tampon de suspension de la Las17, une solution Hepes à 20mM, pH 7,5/KCl à 200mM, ci-après noté tampon HK :  $3,5\mu$ L de solution contenant les billes est dilué au moins 3 fois dans 100 à 200 $\mu$ L de tampon HK puis centrifugée et le surnageant ôté. Elles sont ensuite incubées avec la Las17 à 4 ° C pendant 1 heure en maintenant une agitation constante afin d'éviter la sédimentation et d'exposer de manière homogène les surfaces à la protéine qui s'adsorbe dessus. Les protéines Las17 sont liées à un groupement glutathione-S-transferase (GST) qui a servi à les purifier et qui est suffisamment gros (de l'ordre de 30kDa pour une protéine Las 17 de 67,7kDa [Feliciano et Pietro MBoC 2012]) pour que l'accrochage à la surface par ce groupement soit également possible. S'ensuit une étape d'un quart d'heure d'incubation dans la même solution enrichie de 1% de BSA afin de saturer les éventuels pans de surface encore libres. Les colloïdes sont finalement rincés trois fois avec un volume de 100 $\mu$ L de tampon HK enrichi de 0,1% de BSA afin d'éliminer la Las17 qui ne s'est pas accrochée aux billes. Le volume final se situe autour de 50 $\mu$ L.

Ces billes sont alors prêtes à être ajoutées à une solution protéique contenant les éléments du réseaux d'actine branché à construire. La polymérisation aura lieu depuis la surface. Nous avons vérifié expérimentalement qu'il est possible d'utiliser indifféremment de la Las17 obtenue en levure ou en bactérie.

Nous préparons également des billes passivées, couvertes de BSA selon le même protocole de préparation que pour Las 17 (avec une incubation à 1% de BSA). Ces billes sont mélangées aux bille Las17 dans les chaines, et nous ne considérons que les interfaces entre une bille couverte d'un gel et une bille qui n'en porte pas.

# Préparation des chambres d'observation



FIGURE 3.9 - Schéma d'une chambre d'observation.

Les chambres d'observation sont très simplement construites par l'intercalation de ruban de parafilm entre une lame de microscope et un lamelle ( $100\mu$ m d'épaisseur). Selon le volume de solution que l'on souhaite préparer, on adapte la distance entre les rubans pour ajuster le volume de la chambre. La chambre est chauffée pour faire légèrement fondre le parafilm et assurer l'étanchéité. Après remplissage, les extrémités ouvertes sont scellées par du VALAP, mélange égal en masse de vasoline, lanoline et paraffine.

Les chambres sont systématiquement incubées dans une solution de BSA à 10% pendant 1h à 2h avant usage afin de limiter au maximum les risques d'adhésion au parois de la part des colloïdes. Malgré ces précautions, un peu d'adhésion entre les gels et/ou les colloïdes et la surface est régulièrement observée

# Reconstitution des gels

Cette étape est l'étape finale de la préparation des échantillons biologiques.

# Extrait cellulaire

Un petit volume de billes fonctionnalisées par Las17 à leur surface et de billes passivées avec de la BSA est ajouté à de l'extrait cellulaire  $(0,5\mu$ L de chaque préparation de bille dans  $19\mu$ L d'extrait). Si la souche de levure ayant servi à la préparation de l'extrait n'était pas génétiquement modifiée pour produire une protéine de liaison à l'actine conjuguée avec un fluorophore, de l'actine de levure purifiée et marquée avec Alexa 568 est ajoutée au milieu. La solution est incubée à température ambiante afin de ne pas endommager les filaments d'actine qui se forment. Ce temps d'incubation est variable selon le type d'extrait et la qualité de sa préparation et de celle des billes. Par exemple un double mutant où l'expression de deux protéines a été empêchée pousse généralement beaucoup moins vite que l'extrait sauvage (en terme de temps nécessaire pour obtenir des gels suffisamment épais pour les mesures autour des billes), alors qu'un simple mutant privé d'une protéine de réticulation pousse bien plus vite que le "type sauvage".

Notons ici que Las17 est bien sûr également présente en solution dans l'extrait, mais comme elle est très dense à la surface des billes, c'est là que les filaments d'actine vont croître. Les réseaux d'actine se forment plus rapidement autour des billes que en solution et il n'y a pas de nucléation spontanée dans le milieu, hormis si l'extrait cellulaire est trop vieux (proche des 4 heures après sortie du congélateur).

# Protéines purifiées

Une solution d'actine G et de profiline est préparée de manière à obtenir une concentration d'actine de  $25\mu$ M et une concentration de profiline trois fois plus importante : L'actine G, de l'actine G conjuguée à un fluorophore, une solution d'EGTA à 2mM, une solution de MgCl2 à  $160\mu$ M et un tampon dit "tampon G" contenant l'ATP (Tris Hcl 5mM à pH 8, ATP 0,2mM, CaCl2 0,1mM, DTT 0,5mM, CaCl2 0,1M) sont incubés 5 minutes sur glace. La profiline est ajoutée ensuite et l'ensemble est à nouveau incubé sur glace 3 minutes. Cette solution est appelée "solution d'échange".

Le mélange contenant toutes les protéines est alors préparé : un volume de chaque solution protéique est ajouté. Les volumes sont calculés en fonction des concentrations finales souhaitées. Les protéines initialement trop concentrées peuvent être pré-diluée dans un tampon dit HK150 (100mM d'Hepes à pH 7,5 et de 150mM de KCl).  $3\mu$ L d'une solution à pH 7,5 composée d'ATP à 12mM, MgCl<sub>2</sub> à 24mM, DABCO à 0.88mM et DTT à 20mM sont ajoutés. Un volume de "tampon X" (10mM Hepes pH 7,5, 0,1M KCl, 1mM MgCl2, 1mM ATP, 0,1mM CaCl2) est ajouté pour obtenir un volume final de 13,5 $\mu$ L. Le mélange est alors réparti dans trois éppendorfs. Dans chaque eppendorf est ajouté  $1\mu$ L de billes (0,5 $\mu$ L de billes fonctionnalisées et 0,5 $\mu$ L de billes passivées) au moment de lancer l'expérience. Le volume de billes à ajouter doit être pris en compte dans le calcul des dilutions.

Une fois les billes ajoutées à la solution, l'ensemble est incubé de 1 à 30 minutes à température ambiante selon la composition du mélange puis délicatement mélangé avec une pipette au cône pas trop étroit (pour éviter d'abimer les gels) avant d'être injecté dans une chambre pour observation.

Quel que soit le type de gel reconstitué, nous nous restreignons, pour cette étude, à des réseaux symétriques. Si les gels se brisent et génèrent une comète d'actine il n'est plus possible de l'étudier dans notre système. En effet une bille (superparamagnétique) n'a pas d'axe d'orientation

privilégié dans un champ magnétique, mais aura tendance à se positionner au point de champ maximum. Dans le cas d'une interaction dipolaire attractive avec un autre colloïde, ce maximum s'obtient au contact direct entre les deux objets. Un bille portant un gel brisé aura donc tendance à tourner et ne sera plus en configuration de Hertz.Dans le cas du système de protéine purifiées en particulier, il est possible de contrôler les ratio des différents composants de manière à éviter les situations de brisure de symétrie.

# Chapitre 4

# Propriétés mécaniques des gels d'actine reconstitués

D<sup>ANS</sup> ce chapitre nous allons présenter les caractéristiques des réseaux branchés obtenus autour des billes à partir d'extraits cellulaires de levure. Tout d'abord nous regardons les caractéristiques propres des gels non sollicités mécaniquement. Puis, à l'aide des différents tests en compression auquel notre système de mesure nous donne accès, nous allons étudier les réponses caractéristiques de notre système à différentes sollicitations en mettant l'accent sur la réponse de l'extrait cellulaire de type sauvage.

Par la suite il sera fait référence à cet extrait cellulaire de la souche de levure sauvage par le terme "extrait sauvage". Un mutant ne produisant pas la protéines A est noté "mutant  $a\Delta$ " ou "extrait  $a\Delta$ ". Un double mutant ne produisant pas de A ni de B est désigné par les termes "mutant  $a\Delta$  b $\Delta$ " ou "extrait  $a\Delta$  b $\Delta$ ".

# 4.1 Croissance des gels

Il est nécessaire de laisser pousser les gels autour des billes avant de faire les mesures mécaniques, aussi la première étape consiste à caractériser cette croissance. L'une des forces de ce système réside dans le fait que les réseaux générés sont très denses, ce qui le rend proche des conditions de l'*in vivo*. C'est aussi un désavantage en ce qui concerne la visualisation des réseaux car on ne peut pas distinguer les filaments individuels avec un microscope optique classique. L'actine ou une de ses protéines de liaison est marquée par fluorescence ce qui nous permet de repérer quelles billes portent des gels (Figure 4.1, A.).

# Suivi de la croissance

La figure 4.2 présente des expériences de suivi de la croissance des gels autour des billes (sous faible champ magnétique constant de 3 mT) via la mesure de la distance entre les centres des billes toutes les 10 secondes pendant 60 à 80 minutes. Sur la figure principale sont représentées les données de croissance enregistrées sur 4 jours d'expérience différents pour la levure de type sauvage. La distance entre 2 billes passivées y est affichée en noir et constitue la ligne de base. L'évolution de la distance pour des liaisons doubles (deux gels côte à côte) est elle en bleu, celle des liaisons simples (un gel à côté d'une bille passivée) en violet. Pour des questions de lisibilité, seule la moitié des courbes obtenues sur les 4 journées d'expériences sont présentées ici. La durée d'incubation avant observation, égale ici au temps nécessaire pour remplir la chambre d'observation, la sceller, la positionner sur le plateau du microscope et enfin trouver une chaîne



FIGURE 4.1 - Chaînes autoassemblées de colloïdes superparamagnétiques : images de fluorescence acquises avec un microscope Zeiss, actine fonctionnalisée avec un fluorophore Alexa 568. A. Cas valide. Une interface dite double, trois dites simples et deux dites nues; B. Cas où les gels présentent des inhomogénéités potentiellement gênantes pour les mesures. Actine polymérisée dans la solution visible. Deux interfaces dites doubles, deux dites simples et une dite nue.

de billes observable, varie de 2 à 8,5 minutes pour ces expériences et est notée "tp" (pour "temps de polymérisation dans l'éppendorf"). La très bonne précision spatiale sur la détermination du centre des billes et la mono-dispersité des billes permet de mesurer l'épaisseur des gels avec une bien meilleure précision par rapport à toutes les techniques basées sur la fluorescence. L'observation sur de longues durées cause parfois une dérive du microscope se manifestant par une perte progressive de la focalisation. Cette perte de focus peut être augmentée par le fait que le gels croissent autour des billes, les soulevant par rapport au fond de la chambre sur lequel elles reposent. Le réajustement de la focalisation au court de la mesure cause des sauts dans la valeur de la distance mesurée, nettement observables sur la figure 4.2 (courbes bleues et certaines courbes violettes).

On constate tout d'abord que la croissance se stabilise autour d'une épaisseur propre à chaque gel. Ces plateaux se répartissent en deux groupes correspondants aux liaisons simples d'une part, avec des distances entre 4,6 et  $5,1\mu m$ , et les liaisons doubles autour de  $5,6\mu m$  ou  $6,25\mu m$  d'autre part. Il existe donc des distributions des hauteurs atteintes par les gels, qui permettent de déterminer si une liaison est simple ou double. Cependant il existe aussi une zone intermédiaire où il est impossible de déterminer si l'interface est composée d'un gel unique ou de deux gels sans l'aide de l'image de fluorescence de la chaîne. Par ailleurs, la croissance des gels commence à des temps variables : environ la moitié des gels avaient démarré et presque fini leur croissance avant qu'il soit possible de lancer l'observation des billes (ces courbes n'ont pas été reportées sur le graphe principal de la figure 4.2). Le reste des réseaux démarre à des temps différents (le dernier une trentaine de minutes après mélange des protéines et des billes fonctionnalisées) [Michelot et al. Curr. Biol. 2010]. Les pentes des courbes de croissance sont variables, ce qui signifie qu'au sein d'un même extrait, la dynamique varie. Pour les expériences nous essayons généralement de nous placer à des temps de polymérisation relativement courts afin de ne pas obtenir de gels non sphériques. Pour l'extrait de levure de type sauvage, cela correspondrait à 10 à 20 minutes de polymérisation avant sollicitation mécanique. La droite pointillée jaune sur la figure 4.2 illustre le fait que, à tp = 10 minutes, les gels n'ont pour beaucoup pas fini de croître ou, pour d'autres, pas commencé. Ils sont donc alors dans différents états de maturité, avec des épaisseurs variées.

Il existe une variabilité des hauteurs que l'on mesure à chaque début d'expérience avant la sollicitation mécanique (hauteurs appelées "hauteurs initiales" des gels ou "h0", par opposition à l'épaisseur qu'ils ont à la fin des sollicitations). Cette variabilité est due à une variabilité intrinsèque des gels d'une part et la durée d'incubation choisie pour l'expérience d'autre part.



FIGURE 4.2 – Enregistrement de la croissance des gels autour des billes. la durée de polymérisation des gels en solution avant observation est notée "tp", et va de 2 à 8,5 minutes ici. Données acquises sur 4 journées d'expérience pour le type sauvage, 2 journées pour les mutants scp1Δ et sac6Δ scp1Δ, et 1 journée pour le mutant sac6Δ.

Les 3 graphes plus petits de la figure 4.2 sont issus des mêmes expériences de croissance, réalisées sur des extraits de lignées cellulaires de levure mutantes. L'une de ces lignées n'exprime pas le gène pour la protéine de réticulation Sac6, l'autre celui pour la protéine de réticulation Scp1, et enfin la dernière lignée ne produit ni Sac6 ni Scp1. Les échelles des axes sont les mêmes sur les quatre graphiques, et pour une question de clarté, seules 2/3 des courbes sont présentées dans le cas du mutant  $scp1\Delta$ . On constate que ces trois mutants présentent des dynamiques de croissance des réseaux d'actine branchée différentes entre eux et par rapport au type sauvage. Le mutant  $sac6\Delta$  polymérise très rapidement, et en moins de deux minutes et trente secondes tous les gels ont atteint une épaisseur constante. Le mutant  $scp1\Delta$  présente une croissance nettement plus lente que tous les autres réseaux testés ici (figure 4.2). Cela se traduit par des pentes très faibles sur les courbes de croissances, et des gels qui semblent avoir à peine atteint leur plateau après une heure de croissance. L'initiation de la polymérisation, néanmoins, intervient là encore très tôt (après moins de 4 minutes d'incubation) pour la majorité (plus des deux tiers) des réseaux, tandis que d'autres gels ne démarrent qu'après une demi-heure d'incubation. Enfin, le double mutant  $sac6\Delta \ scp1\Delta$  présente comme pour l'extrait  $sac6\Delta$  une croissance rapide et à l'initiation précoce (pas d'image de la phase exponentielle de croissance, au mieux observation du ralentissement asymptotique de la croissance juste avant le plateau, 2 minutes après début de l'incubation). Liaisons simples et doubles sont aisément reconnaissables à la ségrégation de leurs épaisseurs respectives (4,8 à 5,5 $\mu$ m et 5,6 à 6,1 $\mu$ m, respectivement). Les gels obtenus sont beaucoup plus épais que ceux présentés par les réseaux dont seulement Sac6 ou dont seulement Scp1 est absente.



FIGURE 4.3 – Distribution des épaisseurs initiales des gels pour l'extrait de type sauvage. Moyenne à 287nm +/-105nm sur 158 points.

Sur la figure 4.3, on peut voir la distribution des hauteurs initiales (h0) dans les mesures mécaniques des réseaux reconstitués à partir d'extrait sauvage. Les 158 points présentés ici proviennent de toutes les expériences réalisées sur l'extrait de type sauvage au cours de cette thèse. L'allure de cette distribution est gaussienne, avec une moyenne de 287 nm +/- 105 nm.

#### Évolution de l'épaisseur des gels

Mesurer l'évolution de l'épaisseur des gels avant sollicitation en fonction de la durée d'incubation des extraits avec les colloïdes nous donne une forme de mesure du temps typique de croissance par extrait. Les figures 4.4 et 4.5 présentent l'évolution de h0 avec le temps d'incubation des gels. Ces graphes ne présentent pas tous les points, mais, chacun, plusieurs jours d'expériences.

Le type sauvage présente sur certains jours d'expérience (jours 2 et 4) une dépendance de h0 avec tp. Cette dépendance reste inférieure à la variabilité observée d'un jour d'expérience à l'autre, et cette dépendance n'est pas visible quand on considère tous les points de la figure 4.4. Aux temps d'incubations très courts que nous avons utilisés pour le double mutant (figure 4.5) aucune dépendance de h0 à tp ne peut être observée.

Comme on l'a vu sur la figure 4.2, la dynamique de croissance des gels varie d'un mutant à l'autre, les extraits pour lesquels une ou plusieurs protéines de liaisons sont absentes atteignant pour la plupart leur épaisseur d'équilibre beaucoup plus vite que le type sauvage. C'est ce phénomène qui apparait encore ici sur les valeurs de h0 : les réseaux de la levure sauvage ont besoin

de temps d'incubation supérieurs à ceux du mutant  $sac6\Delta \ scp1\Delta$  avant expérience.



FIGURE 4.4 – Évolution de l'épaisseur des gels avant sollicitation en fonction de la durée d'incubation pour l'extrait sauvage.



FIGURE 4.5 – Évolution de l'épaisseur des gels avant sollicitation en fonction de la durée d'incubation pour le double mutant  $sac6\Delta \ scp1\Delta$ . Notez que l'échelle des temps est dilatée par rapport à la figure 4.4.

#### Bilan : une dynamique variable d'une souche à l'autre

Comme je l'ai décrit dans les paragraphes précédents, le moment d'initiation de la polymérisation, la vitesse de polymérisation, et le niveau du plateau varient d'un type d'extrait à un autre. Afin de laisser suffisamment de gels atteindre une épaisseur suffisante pour nos mesures mécaniques (idéalement quelques centaines de nanomètre, voir chapitre 3), j'ai adapté les temps d'incubation pour chaque type d'extraits. Les temps d'incubation et les épaisseurs obtenues sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Caractéristiques	Epaisseur	Temps d'incubation
Type sauvage	287+/-105nm	10 à 30 minutes
Mutant $sac6\Delta$	486+/-211nm	$5 \ge 15$ minutes
Mutant $sac6\Delta \ scp1\Delta$	523+/-197nm	$2 \ge 15$ minutes
Mutant scp1 $\Delta$	218+/-90nm	20 à 50 minutes
Mutant $sac6\Delta \ abp140\Delta$	646+/-180nm	$5 \ge 20$ minutes
Mutant $abp140\Delta$	214 + -58 nm	10 à $30$ minutes
Mutant $aip1\Delta$	257 + /-105nm	7à $25$ minutes

Les épaisseurs moyennes présentées ici sont calculées sur l'ensemble des expériences réalisées pendant cette thèse, avec un nombre de points bien supérieur au nombre de courbes présentées sur la figure 4.2. Les mutants  $scp1 \Delta$ ,  $abp140\Delta$  ou  $aip1\Delta$  présentent des hauteurs initiales comparables à celle du type sauvage, tandis que tous les extraits  $sac6\Delta$  sont beaucoup plus épais (et poussent sur des temps plus courts).

# 4.2 Mécanique des réseaux assemblés à partir des extraits

# 4.2.1 Mesure du module d'Young et mise en évidence d'une plasticité

# Rampe typique

L'établissement d'une courbe force-distance constitue la mesure la plus simplement réalisable avec les colloïdes superparamagnétiques : une rampe de force croissante est appliquée au réseau, suivie d'une force décroissante (cf Figure 3.6). La pente à l'écrasement, non linéaire à cause de la forme du contact entre gel et microindenteur, nous donne accès au module de Young par l'utilisation du fit hertzien corrigé présenté au chapitre 3. Sur la figure 4.6 on peut voir une courbe force-distance typique obtenue à l'aide d'une rampe de 2 à 80 mT en champ, réalisée sur 15 secondes pour de l'extrait de levure de type sauvage (figure de gauche). Les points en bleu décrivent la courbe de charge, ceux en rouge la courbe de décharge. Une fréquence d'acquisition de 33Hz nous permet d'obtenir beaucoup de points, et un tracé très précis de la réponse. Des forces assez importantes sont atteintes sur ce type de gels, au dessus du nanoNewton. La courbe "aller" est peu incurvée, ce qui est caractéristique d'un gel rigide. Une forte hystérèse apparaît sur le "retour" : la courbe de décharge, non seulement ne suit pas celle de charge, mais surtout se termine, à faibles forces, sur une épaisseur très inférieure à h0. Le fait que les deux courbes ne se superposent pas atteste une dissipation d'énergie dans le système, et la déformation résiduelle pourrait être la signature d'une plasticité ou d'une importante viscosité. Afin d'observer un éventuel retour tardif à l'équilibre du système dû à des effets visqueux, nous avons ajouté à notre protocole expérimental un palier systématique de 15 secondes à faible force, consécutif à la rampe. Le système ne revient pas à l'équilibre dans la majorité des cas. Parfois une augmentation de l'épaisseur est observée durant ce palier; toutefois celle-ci pourrait être due à une reprise de la croissance des gels, comme en atteste une partie des cas, pour lesquels l'épaisseur à la fin du palier est supérieure à h0.

L'hystérèse observée est bien la signature d'une plasticité, et d'un réarrangement structural à l'intérieur des gels. Il peut s'agir d'un réarrangement des protéines de liaison à l'actine sous l'effet de la force (décrochage forcé suivi d'un ré-accrochage pendant que le gel est toujours comprimé amenant à figer la déformation) ou d'une destruction du réseau (brisure des filaments, et désassemblage). En plus de la composante plastique, une composante visco-élastique, due à la rhéologie passive des gels ou à l'activité de polymérisation peut être présente dans notre système. Nous avons essayé d'étudier ce phénomène plus en détail par la suite, que ce soit par les mutations sur les levures pour des protéines très susceptibles de jouer sur cette fixation de la déformation (les protéines de réticulation) ou par des variations des types de sollicitation mécaniques utilisés.



FIGURE 4.6 – *Courbe force-distance* obtenue en réponse à une rampe de force de 2 à 80 mT réalisée en 15,15 s pour un réseau issu de l'extrait de levure de type sauvage.

Comparé aux mesures de réponse à une rampe de force réalisées sur un réseau branché construit par des protéines purifiées de mammifère [Pujol et al. 2012], la plasticité des réseaux d'extraits cellulaires de levure est particulièrement notable. Cependant dans les travaux de Pujol et al., les gels d'actine mammifère ont la particularité d'être fixés par de la phalloïdine. Cette molécule a la capacité de se lier aux filaments d'actine de manière à les couvrir entièrement, arrêtant leur croissance, mais aussi protégeant le réseaux contre d'éventuels dommages mécaniques. Nous avons pu notamment constater que cette molécule agit sur la plasticité du système en l'ajoutant dans les extraits et en effectuant un test sur plusieurs sollicitations successive des même gels (Figure 4.10).

# 4.2.2 Quantification du module d'Young et de la plasticité

La figure 4.7 A. présente la distribution des valeurs du module de Young mesurées sur la souche sauvage. La distribution est asymétrique et ne ressemble pas à une distribution gaussienne. On a ajouté sur la figure le tracé de la distribution lognormale qui correspondrait en rouge. Les deux se superposent très bien. L'encart présente la distribution du logarithme en base 10 des valeurs du module de Young mesurées sur la souche sauvage, qui, cette fois, a une allure gaussienne. Un test de  $\chi^2$  nous a permis de vérifier que l'hypothèse selon laquelle cette distributions est lognormale ne peut pas être réfutée, avec un intervalle de confiance de 97%

(p-value de 0,97). Cela signifie que, nos distributions étant asymétriques, la valeur qui nous intéresse n'est pas la moyenne mais le mode, c'est à dire la classe de valeurs la plus représentée dans l'échantillon. Nous l'obtenons en évaluant la moyenne (et l'écart-type et l'erreur-type) de la distribution du logarithme des valeurs du module élastiques. Lorsqu'il sera fait mention de moyenne des modules d'Young par la suite, cela fera donc référence à  $10^{\text{moyenne} \text{ de } \log_{10} E}$ .



FIGURE 4.7 – Distribution des modules élastiques et des mesures de plasticité pour la levure de type sauvage. 114 points sur la courbe de gauche, 104 sur la courbe de droite. Le décompte du nombre d'occurrences d'une catégorie de valeurs a été redimensionné sur la courbe de gauche pour pouvoir superposer distribution et densité de probabilité du fit lognormal (dont l'aire sous la courbe vaut 1).

Le même calcul a été effectué avec succès pour chaque souche de levure que nous utilisons. Nous considérons donc que nos distributions de modules de Young sont lognormales.

Notons ici que les distributions sont particulièrement larges (plus d'une décade pour le module élastique; plus de 40% pour l'hystérèse) même si elles présentent un pic bien visible. Notre capacité à faire ressortir ce pic confirme la nécessité d'une méthode de mesure à haut débit pour l'étude de systèmes biologiques, intrinsèquement variables. Nous sommes en mesure d'établir un intervalle de confiance resserré autour des moyennes grâce au calcul de l'erreur-type qui prend en compte le nombre de points de mesure. Comme nous nous intéressons à la comparaison des propriétés mécaniques et des paramètres rhéologiques entre différents réseaux, il est important que nous puissions comparer les moyennes et les allures de deux distribution pour tester nos hypothèses. Nous nous efforçons de toujours moyenner nos mesures sur au minimum 3 journées d'expériences indépendantes afin d'éliminer le plus possible d'artefacts.

La figure 4.7 B. présente la distribution des valeurs de l'hystérèse pour la souche sauvage. L'encart rappelle schématiquement le mode de quantification de cette déformation résiduelle.

La plasticité est quantifiée sur les courbes force-distance par le calcul des aires sous les courbes. Nous soustrayons simplement l'aire sous la courbe de « retour » à l'aire sous la courbe de compression, et l'ensemble est normalisé par l'aire sous la courbe « aller » afin d'obtenir une

expression de la déformation résiduelle du réseau allant de 0 (système parfaitement élastique) à 1 (système à 100% plastique) et de comparer des réseaux d'élasticité variant sur plus d'un ordre de grandeur. La mesure de l'hystérèse génère, elle, des distributions d'allure gaussienne dont les grandeurs (moyenne, écart-type ou encore erreur-type) sont faciles à calculer et à manipuler (figure 4.15 B.)

#### 4.2.3 Dépendance de l'élasticité avec le temps de polymérisation

Comme nous l'avons montré dans les paragraphes précédents, la croissance des gels se fait en deux phases (croissance forte puis plateau), et nous ne pouvons pas contrôler dans quels cas se situent les gels sur lesquels nous faisons des mesures mécaniques. De plus, dans les systèmes biologiques, des phénomènes d'évolution au cours du temps peuvent avoir lieu (changements dans la composition ou de l'architecture des gels par exemple). Or, *in vivo*, les patchs endocytiques évoluent puisque les partenaires de l'actine n'y sont pas toutes recrutées en même temps [Goode et al., 2015]. On peut citer l'exemple de deux CL, Sac6 et Scp1 : le premier est recruté dès l'arrivée de l'actine sur le site d'endocytose tandis que le second n'est détecté dans les patchs que dans la phase finale de construction du réseau d'actine, pendant l'invagination et juste avant scission vésicule [Gheorghe et al., 2008]. De plus, la totalité du processus d'endocytose se déroule en moins de deux minutes chez la levure.

Nous travaillons sur des réseaux âgés d'au moins 2 à 3 minutes dans le meilleur des cas (délai minimal de remplissage de la chambre, d'installation sur le microscope et de formation des chaînes). La moyenne se situe entre 10 et 20 minutes selon les souches (délai de croissance de gels suffisamment épais autour des billes). Nos réseaux se trouvent donc *a priori* tous dans les même conditions de maturité. Néanmoins, certaines études montrent une évolution des propriétés mécaniques des gels d'actine réticulés à très long terme (plusieurs heures), qui correspondrait à une relaxation du stress interne aux réseaux [Lieleg et al. Nature material, 2011].

Nous avons donc cherché à caractériser l'évolution des propriétés mécaniques de nos réseaux sur durées pertinentes avec nos expériences.



FIGURE 4.8 – Évolution du module élastique avec la durée de polymérisation pour les gels de l'extrait sauvage.



FIGURE 4.9 – Évolution de l'hystérésis avec la durée de polymérisation pour les les gels de l'extrait sauvage.

Les figures 4.8 et 4.9 présentent l'évolution du module d'Young et de l'hystérèse des gels issus de l'extrait sauvage avec la durée de polymérisation. La majorité des mesures se situe dans la gamme de durées nécessaires pour obtenir des épaisseurs de gels suffisantes pour les mesures (cf paragraphe 4.1).

Dans la gamme de durées de polymérisation où nous travaillons, ni le module de Young, ni l'hystérèse ne varient avec la durée d'incubation, ce qui semble confirmer l'hypothèse de réseaux branchés matures.

Cependant, un phénomène expérimental atteste de l'évolution des extraits. La durée d'incubation nécessaire avant observation semble plus importante en début d'expérience, quand l'extrait est très frais, et à la fin, quand les protéines perdent leur activité, avec un optimum au bout d'environ une heure de manipulation (soit une heure après la fin de l'étape de centrifugation). Cette caractéristique semble difficile à attribuer à une propriété biologique pertinente pour la cellule, et parait être une spécificité de notre protocole expérimental. On peut s'interroger sur l'impact des étapes de stockage et de préparation des extraits sur les amorces d'actine en solution : peut-être sont-elles dépolymérisée par le froid pendant la période de stockage ou bien éliminée lors de l'ultracentrifugation, auquel cas un délai serait nécessaire à l'extrait pour que de nouveaux brins soient générés. La quantité de billes fonctionnalisées avec Las17 ajoutée à la chambre pourrait éventuellement jouer un rôle. En effet, quelques chambres sont généralement nécessaire au début d'une expérience pour ajuster finement la quantité de billes à ajouter à l'extrait. Or un excès de billes pourrait causer des phénomène de déplétion locale en Arp2/3 ou en actine.

#### 4.2.4 Répétition des sollicitations

L'existence d'une forte hystérèse sur les réponses à une rampe de force soulève la question de la répétition de la sollicitation sur un même gel. La courbe de gauche de la figure 4.10 ci-dessous présente un exemple de répétition de cinq rampes. Nous constatons d'une part que l'allure de l'indentation varie à chaque nouvelle sollicitation (sauf quelques cas où la courbe se stabilise vers la cinquième sollicitation), et que l'hystérèse ne s'annule pas. Mais surtout, à cause du non-retour au point initial, l'interface entre les réseaux et la bille d'indentation reste déformée à la fin de la première sollicitation, selon des modalités qui sont inconnues. Ne pouvant plus connaître l'aire de contact, nous ne pouvons plus utiliser le modèle de Hertz sur nos courbes et ne pouvons donc plus en tirer autant d'information.



# FIGURE 4.10 − Rampes successives sur double mutant sac6∆ scp1∆. Rampes réalisées en 15,15 s chacune, de 2 à 80 mT, du vert au violet dans l'ordre des sollicitations : 1ère sollicitation en vert clair, dernière en violet clair. Courbes de gauche lissées sur 10 points pour des questions de lisibilité. Courbe de droite : interfaces doubles; Les courbes vertes claires lisses représentent les fit réalisés sur chaque courbe de charge.

La figure 4.10, à droite, montre six sollicitations successives, cette fois pour un réseau recouvert de phalloïdine. Les courbes successives se recouvrent presque dès la troisième sollicitation : on a récupéré des réseaux élastiques. La phalloïdine est une molécule qui se lie à l'actine et recouvre les filaments, les protégeant des dommages et empêchant leur dépolymérisation. Son addition permet de mieux contrôler l'homogénéité des échantillons en arrêtant la croissance des gels de manière contrôlée. Cependant, elle modifie les propriété mécaniques des filaments qu'elle recouvrent, en multipliant par deux leur module de flexion [Isambert et al., 1995]. De plus son affinité pour l'actine est très forte, et elle recouvre les filaments au détriment d'autres protéines qui les décorent normalement.

Comme nous souhaitons rester au plus près des conditions cellulaires, nous n'ajoutons pas de phalloïdine dans nos expériences. Une conséquence directe de la plasticité de nos gels sur les mesures est la perte de la possibilité de répéter des sollicitations sur un même gel, et même sur toute une chambre.

# 4.2.5 Influence de la force maximale appliquée sur l'hystérèse

La figure 4.11 présente l'évolution de l'hystérèse en fonction de la force maximale. A l'exception des valeurs obtenues pour Fmax entre 1000 et 1200 pN (calculée sur 11 points seulement), l'hystérèse normalisée se situe toujours autour de 0,51 de moyenne, et semble donc indépendante de la force maximale atteinte pas la rampe.



FIGURE 4.11 – Évolution du taux de déformation résiduelle avec la force maximale atteinte par la rampe de force.

Les points bleus correspondent aux mesures, les points noirs aux moyennes calculées par tranche de 200 pN en force. Les critères de validité utilisés ici sont une force maximal atteinte supérieure à 500 pN afin de faire apparaître des points de plus faible force maximale atteinte.Moyenne sur 600 à 800 pN : 6 points, moyenne sur 1000 à 1200 pN : 11 points, moyenne sur 1200 à 1400 pN : 30 points, moyenne 1400 à 1600 pN : 27 points, moyenne 1600 à 1800 pN : 11 points. L'hystérèse ne diminue pas significativement quand on diminue la force maximale de sollicitation. Or, classiquement un phénomène de plasticité est observé avec un seuil de contrainte. Nous avons réalisé des mesures avec des rampes de champ magnétique sur une gamme allant de 2-10 mT à 2-80 mT et nous n'avons pas mesuré de seuil de plasticité. 10 mT représente une force faible, de l'ordre de seulement 200pN. Diminuer encore la hauteur de la rampe de force utilisée diminueraient beaucoup la qualité de la mesure, c'est pourquoi nous n'avons pas dépassé cette limite. Il faut noter qu'à cause du contact hertzien, la contrainte n'est pas homogène dans le gel (maximale au centre de la zone de contact et nulle sur les bords), ce qui peut être une raison pour l'absence de seuil visible. De plus, d'après les relations établies au chapitre 3 (équations 3.3 et 3.4), on peut montrer que la contrainte varie environ comme la force puissance 1/3. Cela donne, pour une division de la force maximale atteinte lors d'une rampe par 8 (200 pN au lieu de 1600 pN), une division de la contrainte maximale de l'ordre de 2 seulement. Enfin, il est possible que des réarrangements aient lieu dans les gels a des échelles de temps si rapides qu'il n'existe pas de seuil de plasticité à notre échelle de mesure.

# 4.2.6 Insensibilité de l'hystérèse à la rigidité du gel

L'hystérèse mesurée pour un extrait cellulaire donné semble parfaitement indépendante de la mesure du module élastique obtenue (Figure 4.12).



Dépendance de l'hystérèse avec le module élastique pour le type sauvage

FIGURE 4.12 – Dépendance de l'hystérèse et du module d'Young. Fit réalisé sur 1000 pN.

Chaque point représente une mesure de E et de l'hystérèse sur rampe de force. On constate que l'hystérèse est indépendante du module de Young : la plasticité, donc, qui rend compte de la viscosité du système, de la réorganisation et des dommages subis lors d'une sollicitation mécanique, ne dépend pas de la rigidité du réseau.

# 4.2.7 Dépendance du module à la vitesse de sollicitation

Nous avons réalisé des mesures avec des rampes sur des temps variables, dont les résultats sont présentées sur la figure 4.13 pour le type sauvage.



FIGURE 4.13 – Variation du module d'Young en fonction de la pente de la rampe de champ magnétique. Fit réalisé sur 500pN.

Sur la figure 4.13 sont présentées les moyennes du module élastique évaluées à différentes vitesse des rampes de force. Outre l'élasticité estimée avec les rampes "classiques" de variation du champ entre 2 et 80 mT en 15,15 s, des rampes dites « rapides », réalisées en 1,5 s, ont permis de multiplier par 10 la vitesse moyenne de sollicitation. Enfin, ont été ajouté de faibles vitesses de sollicitation avec des rampes de forces réalisées en 15,15 s, comme les rampes « classiques », mais avec un maximum de champ magnétique inférieur à 80 mT (de l'ordre de 35 mT), ce qui donne des pentes moyennes de 4,5 mT/s, soit deux fois moins que pour les rampes classiques <sup>1</sup>. En raison du plus faible maximum en champ magnétique de la sollicitation, le maximum de force n'atteint parfois pas 1000 pN, aussi pour cette figure nous avons mesuré le module d'Young à partir de fits jusqu'à 500 pN seulement.

Le module d'Young varie linéairement avec le logarithme de la pente des rampes. Cela montre une forte dépendance de l'élasticité du réseau avec la vitesse de sollicitation.

Plus l'on se place à faible vitesse de sollicitation plus la probabilité que des réarrangements aient lieu dans les réseaux pendant la rampe de force est élevée. L'augmentation du module d'Young avec la vitesse de sollicitation semble le confirmer. La rampe "classique" est réalisée en 15,15 s, ce qui peut être lent à l'échelle des dynamiques d'interaction avec l'actine de certaines des 90 protéines des réseaux. Cela expliquerait que des partenaires de l'actine ayant une influence

<sup>1.</sup> expériences menées pour la mesure de l'impact du maximum de force atteint sur l'hystérèse

sur l'élasticité puissent être détectées ou non suivant la vitesse de sollicitation. Nous pousserons cette analyse plus loin au chapitre 5 avec l'étude des protéines de réticulations.

# 4.3 Des réponses très différentes dans le cas du système "minimal"

Comparons maintenant ces résultats aux mesures réalisées sur un système de protéines purifiées de levure permettant de reconstituer des réseaux branchés avec un minimum de cinq protéines de patchs endocytiques : actine, Arp2/3, la protéine de coiffe (notée ici "CP"), Las17 et profiline.

Nous nous plaçons par la suite aux concentrations de protéines cellulaires présentées au chapitre 3 pour étudier plus avant la mécanique de ce système simplifié ([CP]=400nM; [Actine]g=1,2 $\mu$ M; [Profiline]=3,6 $\mu$ M; [Arp2/3]=25nM). Les gels poussent très bien autour des billes (durée de polymérisation nécessaires de 2 à 10 minutes). Ils sont épais, avec une moyenne autour de 500 nm +/-280 nm, et ont même tendance à se briser pour former des embryons de comète. Il a été observé sur des réseaux de protéines mammifères [van der Gucht et al., 2005] que la présence de CL retarde l'apparition de comètes.

# Module d'Young et hystérèse

L'allure d'une courbe force-distance sur le système minimal de protéines purifiées est très différente de celle de l'extrait sauvage.



FIGURE 4.14 – Courbe force-distance de réponse à une rampe 2-80 mT en champ magnétique réalisée en 15,15 s sur le système de protéines purifiées. En bleu, la courbe de compression, en rouge, la courbe de décompression.

Même pour des gels d'épaisseurs comparables entre le système de protéines purifiées et l'extrait de type sauvage, l'indentation lors d'une rampe de 2 à 80mT est beaucoup plus importante pour les gels de protéines purifiées. Par exemple, sur la courbe présentée sur la figure 4.14, un gel d'environ 250nm d'épaisseur est indenté sur 200nm, soit une déformation du matériau de 80%! La courbe présentée sur la figure 4.6 pour l'extrait sauvage n'arborait qu'une déformation d'environ 20%. Ce point est caractéristique de réseaux plus mous. En effet, le module d'Young mesuré sur ce système est six fois plus faible que celui de l'extrait « sauvage », inférieur à 1kPa. Aucun des mutants que nous avons testé à ce jour ne présente de valeurs si faibles, point dont
nous discuterons au chapitre 5.



FIGURE 4.15 – Comparaison des distributions du module d'Young et de l'hystérèse pour l'extrait sauvage et le système de protéines purifiées. En gris les nuages de points, en rouge les moyennes et erreur-type.

L'hystérèse de ce système de protéines purifiées est présentée sur la figure 4.15, graphe de droite. Sa moyenne vaut 0,4 (avec un intervalle de confiance à 95 % de 0,38 à 0,42), la mesure de déformation résiduelle est à la fois inférieure à toute les mesures obtenues sur les différents extraits , et à la fois non négligeable.

L'ensemble de ces observations confirme l'intérêt de la mise en place des deux approches, "bottom-up" et "top-down", pour cette étude comparative des propriétés des partenaires de l'actine sur la mécanique des réseaux branchés.

#### 4.4 Conclusion

Notre système nous permet de travailler *in vitro* sur des réseaux très denses et branchés, très proches de ceux observés dans la cellule. La croissance des réseaux à la surface de nos colloïdes se déclenche de manière aléatoire, à des moments différents, mais certains gels poussent plus vite et plus fort (avec une épaisseur d'équilibre plus importante) que les autres : les réseaux dont Sac6 est absente. L'absence d'une protéine de réticulation considérée comme la principale responsable de l'attachement des filaments entre eux au sein de ces réseaux (hors branches) permet donc une croissance plus rapide des gels.

Les réseaux branchés assemblés à partir des extraits de levure se caractérisent par une dualité entre une rigidité forte (modules d'Young distribués autour de 6200 Pa) et une plasticité. L'hystérésis observée est générée par plusieurs phénomènes, viscosité, réorganisation et destruction du réseau, qu'il n'est pas possible d'analyser séparément pour le moment. Elle semble être, d'après les résultats des expériences de rampes de force, indépendante de l'élasticité, ce qui soulève l'idée que l'on puisse altérer l'une sans toucher à l'autre. L'étude des partenaires de l'actine pourrait nous permettre de discriminer leur influence sur telle ou telle caractéristique mécanique. Les informations déjà connues sur certaines de ces protéines pourraient éventuellement aider ensuite à déterminer quelles composantes sont dominantes dans les phénomènes observés. Sur le plan technique, une géométrie de contact à évolution non linéraire pour l'étude d'un système de réponse lui aussi non linéraire présente de nombreuses contraintes, c'est pourquoi l'équipe a mis au point une nouvelle géométrie de colloïdes ([Tavacoli et al. Soft Matter 2013]; [Mesures mécaniques et génération de forces de réseaux d'actine branchés avec des micro-cylin-dres magnétiques, thèse de Pierre Bauër, 2015]). Ces colloïdes produits au laboratoire sont mis en solution selon un protocole qui n'autorise pas l'adsorption de Las 17 à la surface selon les modalités utilisées à ce jour pour les billes superparamagnétiques. La prochaine étape de cette étude du système de levure, qui consiste à réussir à transférer le protocole à des colloïdes cylindriques permettant de solliciter des interfaces planes, est discutée dans les perspectives.

### Chapitre 5

# Etude de l'influence des protéines de réticulation

L'A levure bourgeonnante compte cinq types de protéines différentes ayant de potentielles fonctions de réticulation comme nous l'avons vu au chapitre 2. Dans ce chapitre qui représente le coeur de cette thèse, nous avons étudié l'impact sur la mécanique des gels de trois d'entre elles, Sac6 (homologue de fimbrine chez les mammifères), Scp1 (homologue de transgeline/calponine chez les mammifères) et Abp140 à l'aide du test mécanique "classique" de notre système, la rampe de force.

En premier lieu nous comparons l'élasticité et la plasticité de réseaux issus de différents mutants pour ces protéines. Cela nous permet de mettre en évidence des comportements différents pour chacune d'elles. Afin d'expliciter les phénomènes observés, nous réalisons des tests complémentaires. Une première mesure en variant la pente des rampes de force nous renseigne sur la dynamique de Scp1. Ensuite, la réalisation de courbes dose-réponse pour Sac6 dans le système de protéines purifiées et dans les extraits mutants nous permet de confirmer le rôle de cette protéine de réticulation tout en faisant apparaître de nouveaux comportements inattendus.

# 5.1 Variations de l'élasticité et de la plasticité en fonction de la protéine de réticulation

Nous comparons ici le module d'Young et l'hystérèse pour différents mutants ne produisant pas de Sac6, Scp1, et/ou d'Abp140 sur des rampes de force réalisées en 15,15 secondes, avec un champ magnétique maximal de 80mT. Nous accédons au module de Young par un fit de la courbe de compression sur la gamme de forces allant de quelques piconewton à 1000 pN.

#### 5.1.1 module d'Young



FIGURE 5.1 – Module de Young pour les différents gels testés.
En gris le système de protéines purifiées; en rouge l'extrait sauvage; en vert différents mutants auxquels manquent une ou plusieurs protéines de réticulation. Chaque cercle correspond à un point de mesure; chaque carré plein est une moyenne à laquelle sont associées des barres d'erreur (calculées sur la distribution du logarithme des valeurs présentées ici). N indique le nombre de points de mesure par distribution. Le trait en pointillé situe la moyenne pour l'extrait sauvage.

Les trois extraits dans lesquels Sac6 est absente sont beaucoup plus mous que l'extrait sauvage (passage de 6200 Pa à 3600, 3200 et 2500 Pa de moyenne, respectivement) tandis que le module de Young de l'extrait  $abp140\Delta$  et de l'extrait  $scp1\Delta$  est le même que celui de la souche sauvage. L'extrait  $sac6\Delta$  est toutefois plus rigide que l'extrait  $sac6\Delta$   $abp140\Delta$ . Le système de protéines purifiées présente la différence de module de Young la plus spectaculaire avec une chute à 1000 Pa. La différence de module entre les gels du système purifié et les extraits, y compris les trois extraits sans Sac6 (dont les moyennes sont encadrées sur la figure 5.1), est très marquée.

Un test de Student (t-test) à deux variables indépendantes réalisé sur les mesures du module élastique présentées sur le figure 5.1 permet de comparer plus précisément les distributions deux à deux. La comparaison du mutant  $abp140\Delta$  à l'extrait sauvage par exemple, confirme que les distributions sont de même moyenne, avec une p-value de 0,46. L'extrait sauvage et l'extrait  $sac6\Delta$  présentent bien des réseaux de module significativement différents (p-value de 7 · 10<sup>-7</sup>). Le mutant  $sac6\Delta$  et le mutant  $sac6\Delta$   $scp1\Delta$  sont non significativement différents (p-value de 0,30). En revanche le mutant  $sac6\Delta$  est significativement différent du mutant  $sac6\Delta$   $abp140\Delta$ (p-value de 0,008). Le mutant  $sac6\Delta$   $scp1\Delta$  est non significativement différent du mutant  $sac6\Delta$  $abp140\Delta$  (p-value de 0,057). Toutes les distributions de mesures pour les extraits cellulaires comptent une centaine de points, sauf le mutant  $sac6\Delta$   $abp140\Delta$  qui n'en a que 50.

Les valeurs de module élastique mesurées pour nos différents extraits nous permettent d'affirmer que la protéine de réticulation Sac6 joue un rôle prédominant dans l'élasticité des réseaux chez la levure. Nous constatons également que la présence de cette protéine n'est pas le seul facteur responsable de sa rigidité puisque son absence ne fait pas baisser celui-ci jusqu'à la valeur du système de protéines purifiées. Ni Scp1 ni Abp140 ne paraissent jouer un rôle dans l'élasticité des réseaux branchés où Sac6 est présente. Peut-être d'autres protéines de réticulations présentes dans le système ou des protéines d'autres familles de partenaires de l'actine sont impliquées dans l'élasticité des gels.

On peut toutefois remarquer que la baisse du module pour les réseaux  $sac6\Delta \ abp140\Delta$  par rapport à celui des réseaux  $sac6\Delta$  fait penser à une situation de « sauvetage », où dans le cas général Sac6 serait la protéine la plus présente dans les réseaux, mais en son absence (cas du mutant ne produisant aucun Sac6), d'autres protéines de réticulation comme Abp140 entreraient en jeu et parviendraient à sauvegarder partiellement la fonction de rigidification des réseaux. Cela voudrait dire que Abp140 occupe une fonction secondaire dans la rigidification des réseaux, tandis que Scp1 n'y participe pas de façon significative.

#### 5.1.2 Hystérèse

L'hystérèse de la réponse mécanique à une rampe de compression, telle que définie aux chapitres 3 et 4, nous permet de quantifier la déformation résiduelle des réseaux après sollicitation et de comparer leurs plasticités relatives. Tout d'abord nous constatons que les extraits cellulaires, et en particulier l'extrait sauvage, présentent tous une forte hystérèse. Les deux extraits dans lesquels Sac6 est absente mais Scp1 présente (extraits  $sac6\Delta$  et  $sac6\Delta$   $abp140\Delta$ ) ont une hystérèse très supérieure à celle de l'extrait sauvage (passage de 56% de déformation résiduelle à 70 - 71%) tandis que dans le cas du mutant  $sac6\Delta$   $scp1\Delta$ , l'hystérèse augmente très peu. L'extrait  $scp1\Delta$  présente la même réponse que l'extrait sauvage (avec même une diminution de la déformation résiduelle, mais non significative : p-value = 0,08). Le mutant  $abp140\Delta$ , alors qu'il ne présente pas de modification de son module élastique, est le seul à arborer une hystérèse significativement plus faible que l'extrait sauvage. Cependant dans aucun cas l'hystérèse ne diminue au niveau de celle observée dans le système de protéines purifiées dépourvu de protéine de réticulation.





La quantification de la plasticité de la réponse de chacun des mutants à une rampe de force met en avant le rôle de Scp1 dans ce phénomène : Scp1 favoriserait fortement la plasticité en l'absence de Sac6. Comme précédemment, il semblerait que la protéine Sac6 soit "dominante" dans les réseaux, puisque le phénotype lié à la présence de Scp1 ne s'exprime qu'en son absence, et qu'en l'absence de Scp1 par ailleurs, la plasticité des réseaux diminue à peine. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées ici. Il peut y avoir concurrence entre Sac6 et Scp1 pour la liaison à l'actine, auquel cas Sac6 semble dominer. Il pourrait également y avoir une question d'échelle de temps des interactions entre protéines et filaments d'actine. Si le temps caractéristique d'attachement de Scp1 est inférieur à la durée caractéristique d'une sollicitation, alors ces protéines de réticulations peuvent entrainer une faible réponse élastique, mais ajouter une viscosité au système qui expliquerait la plus forte hystérésis.

Deux autres points intéressants apparaissent sur la figure 5.2 : un extrait  $sac6\Delta \ scp1\Delta$  présente une plasticité plus élevée que celle des réseaux sauvages (hystérèse de 0,62 au lieu de 0,56 avec une p-value de 0,006). Cette tendance montre que d'autres partenaires de l'actine participent à la réponse plastique. Or, justement, dans cet extrait Abp140 est toujours exprimé et on a montré que son absence entraine une baisse de l'hystérèse mesurée. Il semble donc que Abp140 favorise aussi la plasticité des réseaux. De plus il semblerait que Abp140, si elle influence moins fortement la plasticité que Scp1, est capable de le faire même en présence de Sac6, et souffrirait donc moins d'une concurrence possible avec Sac6 pour la liaison à l'actine.

En conclusion, nous voyons avec ces mesures du module élastique et de l'hystérèse qu'au sein d'une même famille de partenaires de l'actine, les protéines de réticulation, des fonctions très différentes vis à vis de la mécanique des réseaux apparaissent. Les différentes protéines de réticulation ne sont donc pas interchangeables et l'absence de l'une n'est pas toujours compensée par les autres. De plus, la fonction de chaque protéine serait possiblement pondérée par sa dynamique d'attachement à l'actine. Afin d'étudier ces deux points plus avant, nous avons réalisé différents tests qui sont présentés dans les paragraphes suivants : l'ajout de Sac6 dans le système minimal afin d'analyser les effets de l'apparition de points de réticulation différents des branchements, des mesures sur extraits mutants  $sac6\Delta$  auxquels la protéine est ajoutée pour vérifier quelle évolution des propriétés mécaniques apparaît, et enfin des mesures sur extraits en faisant varier la pente de la rampe de force pour essayer d'identifier une dynamique des protéines de réticulation comme Scp1.

#### 5.2 Influence de la vitesse de sollicitation

Afin d'étudier l'influence de la dynamique des protéines de réticulation sur la réponse mécanique des réseaux (i.e. l'effet de la durée d'accrochage d'une protéine en un point du réseau), nous avons réalisé des mesures à différentes vitesses de sollicitation : les rampes "classiques", en 15,15s, ont été assorties de rampes "rapides" en 1,5s pour les extraits cellulaires de type sauvage, mutant  $sac6\Delta$  et mutant  $sac6\Delta$   $scp1\Delta$ .

Un changement de dynamique de sollicitation peut avoir des effets sur la réponse mécanique du système. Il peut faire apparaître le rôle mécaniques de certaines protéines dont le temps de demi-vie au sein du réseau est inférieur au temps caractéristique de sollicitation choisi jusqu'à présent, phénomène que nous espérons mettre en évidence pour Scp1. Il peut également faire surgir des phénomènes visqueux non décelés à des vitesses plus faibles.

#### Comparaison de l'élasticité et de l'hystérèse à deux vitesses de sollicitation différentes

Sur la figure 5.3, on peut voir qu'une multiplication par 10 de la vitesse de sollicitation entraine une augmentation de l'élasticité pour deux des extraits testés : d'un facteur 1,6 pour le type sauvage et 1,4 pour le mutant  $sac6\Delta$ . Les réseaux issus de l'extrait du mutant  $sac6\Delta$  $scp1\Delta$  ne présentent pas d'augmentation significative de leur élasticité.

L'hystéresis, à l'inverse, ne varie pas significativement lors de ce changement, sauf en ce qui concerne le double mutant  $sac6\Delta sp1\Delta$ , pour lequel elle augmente de 0,62 à 0,69 en moyenne, s'éloignant encore du phénotype sauvage (Figure 5.4).

Les réseaux qui contiennent Scp1 voient leur module élastique augmenter lorsque la pente de la rampe de force est multipliée par 10, tandis qu'un réseau sans Scp1 n'est pas affecté. Une hypothèse pour expliquer ce résultat serait qu'en augmentant la vitesse de la sollicitation, nous aurions franchi un seuil de « détection » de Scp1, c'est à dire que nous réaliserions la sollicitation à une échelle de temps inférieure à celle à laquelle la protéine interagit avec l'actine. Les protéines Scp1 présentes dans le réseau n'auraient pas le temps de se détacher pendant une rampe réalisée à 100mT/s et de nouveaux points de réticulation seraient donc sentis par rapport à une mesure à 10mT/s. Nous discuterons au chapitre 6, « Perspectives », de la possibilité de confirmer et quantifier cette différence de dynamique d'interaction avec l'actine entre Sac6 et Scp1 par des expériences de FRAP.



FIGURE 5.3 – Effet de la vitesse de sollicitation sur l'élasticité pour l'extrait sauvage (carrés), le mutant sac6Δ (triangles) et le mutant sac6Δ scp1Δ (étoiles).
fit sur 1000 pN; rouge pour les rampes à 100mT/s; noir pour les rampes à 10mT/s; moyennes et erreur-types.





fit sur 1000 pN; rouge pour les rampes à 100mT/s; noir pour les rampes à 10mT/s; moyennes et erreur-types.

La sollicitation ayant lieu entre les même bornes de force dans le cas rapide et dans le cas lent, il n'est pas surprenant que la plasticité des réseaux ne soit pas affectée par le changement de pente -pour les deux réseaux contenant le plus de points de réticulation. Les gels issus du mutant  $sac6\Delta \ scp1\Delta$ , cependant, voient leur hystérèse augmenter significativement avec la vitesse de la sollicitation. Les principaux CL des réseaux étant absents, on peut supposer que le gel s'en trouve beaucoup plus sensible aux éventuels effets visqueux qui peuvent apparaitre aux temps courts.

Cette expérience confirme que Sac6 et Scp1 ont des modes d'interaction avec l'actine différents, et que cela influe fortement sur la dynamique des réseaux construits avec l'une ou l'autre des protéines.



#### 5.3 Validation dans le système purifié : ajout de Sac6

FIGURE 5.5 – Courbes force-distance caractéristiques pour chaque concentration de Sac6 ajouté au système minimal.

Les protéines de réticulation, et en particulier Sac6, semblent jouer un rôle important dans la mécanique des réseaux d'actine branché de la levure. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'influence de l'ajout de Sac6 dans le système purifié minimal. La figure 5.5 présente des courbes typiques de réponse (évolution de l'épaisseur des gels avec la force) en fonction de la concentration de Sac6 ajoutée. Chaque courbe correspond à un gel différent. On y voit nettement une évolution de l'allure de la courbe, à la fois de l'épaisseur des gels avant sollicitation (points les plus à gauche sur les courbes bleues) et à la fois de l'indentation maximale atteinte au cours de la rampe. Alors que la courbe pour 100nM de Sac6 est très différente de celle de l'extrait de type sauvage (courbe dans le cadre vert à droite), celles où la concentration atteint 250nM ou plus lui sont très similaires.

#### 5.3.1 Module d'Young

La mesure quantitative des modules élastiques pour les quatre concentrations de Sac6 présentées ci-dessus : 100nM, 250nM, 500nM et  $1\mu$ M donne le graphe ci-dessous (Figure 5.6). On y constate que l'ajout de Sac6 au système augmente sa rigidité. Le phénotype mécanique du réseau évolue vers celui du type sauvage, et la valeur du module élastique est restaurée, puis dépassée, alors que l'on augmente la concentration en Sac6. Cela correspond aux observations phénoménologiques de la figure 5.5. Expérimentalement  $1\mu$ M de Sac6 correspond au maximum atteignable car alors que la concentration de protéine ajoutée atteint la concentration d'actine dans le système, les gels se développent de plus en plus difficilement autour des billes, ce qui rend les expériences difficiles. La concentration approximative de Sac6 dans nos levures de type sauvage a été déterminée par A. Guillotin à l'IBDM. Elle est seulement de l'ordre de 25nM, soit dix fois plus faible que les concentrations nécessaires pour obtenir le même module de Young dans le système purifié. Ce résultat suggère que Sac6 suffit a restaurer un phénotype de type "extrait sauvage" pour l'élasticité dans le système de protéines purifiées, mais que dans la cellule elle n'agit pas seule.



FIGURE 5.6 – Courbe dose-réponse du module d'Young pour Sac6 dans le système de protéines purifiées.

#### 5.3.2 Hystérèse

La mesure de l'hystérèse de ces différents gels, montre une augmentation de la plasticité avec la concentration en protéine de réticulation Sac6. A nouveau, les valeurs atteignent puis dépassent celle de l'extrait de type sauvage (cf Figure 5.7). Un effet de saturation est observé pour une valeur d'environ 60% de déformation résiduelle, et ce plateau est atteint pour une concentration de Sac6 comprise entre 100 et 250 nM. Cet effet est à la fois attendu : le système sauvage présente une hystérèse beaucoup plus importante que le système minimum sans protéine de réticulation ; et surprenant : alors que les réseaux deviennent plus rigides quand on augmente leur concentration en protéine de réticulation Sac6, leur plasticité s'accroît, soit l'évolution inverse de celle observée pour les extraits. En effet les mutants sans Sac6 qui présentent un module de Young plus faible que le type sauvage montrent également une hystérèse plus importante.



FIGURE 5.7 – Courbe dose-réponse de l'hystérèse pour Sac6 dans le système de protéines purifiées.

En résumé, la présence d'une protéine de réticulation dans un réseaux d'actine branché augmente sa rigidité. La création de nouveaux points de réticulation par un CL dans le système de quatre protéines purifiées suffit par ailleurs à restaurer le phénotype du type sauvage pour l'élasticité et l'hystérèse : les réseaux retrouvent des valeurs d'élasticité et de plasticité analogues à celles mesurées sur les réseaux sauvages. La concentration de Sac6 à ajouter pour récupérer le phénotype du type sauvage est la même pour l'élasticité et pour l'hystérèse. Cependant cette récupération du phénotype intervient à des concentrations de Sac6 plus de 10 fois supérieures à celle mesurées dans la cellule. Cet effet pourrait s'expliquer par une coopération de plusieurs protéines au sein des grandes familles de partenaires de l'actine et entre-elles pour générer un phénotype mécanique : *in vivo*, Sac6 a la capacité d'agir sur l'élasticité et la plasticité des réseaux d'actine branchés, joue apparemment un rôle important dans les deux (génération de points de réticulation qui rigidifient le gel), mais n'est pas la seule protéine impliquée.

#### 5.4 Supplémentation en Sac6 des mutants

Les figures 5.8 et 5.9 présentent les modules d'Young et l'hystérèse des gels assemblés à partir d'extraits mutants sans Sac6 auxquels on ajoute des concentrations contrôlées de Sac6 purifiée.



FIGURE 5.8 – Évolution du module d'Young avec addition de Sac6 purifié. Cercles : points de mesure pour les expériences de supplémentation, carrés : moyennes et barres d'erreur; bleu : mutant sac6Δ, vert : mutant sac6Δ scp1Δ, gris : système de protéines purifiées; ligne pointillée : valeur moyenne pour l'extrait de type "sauvage", noté WT.

Les effets observés vont bien dans le même sens que ceux obtenus pour le système purifié : module élastique et hystérèse augmentent avec la concentration de Sac6. Pour le module d'Young on retrouve bien les valeurs du type sauvage, même si cela nécessite l'utilisation de concentrations en Sac6 plus élevées que ce qui a été mesurée chez la souche sauvage (environ 100 nM ici). Pour l'hystérèse en revanche, on s'éloigne encore plus de la valeur mesurée sur le type sauvage.

La pente est cependant différente selon le type de réseau (Figure 5.9). Si l'on s'intéresse aux points où la concentration de Sac6 ajouté n'excède pas 100 nM, on constate que le double mutant voit sa plasticité augmenter brusquement pour atteindre des valeurs supérieures à celles atteintes dans cette même gamme de concentrations pour le système purifié. Le mutant  $sac6\Delta$ , en revanche, voit son hystérèse augmenter linéairement mais très faiblement sur la gamme [0;250nM], à partir d'une valeur d'environs 0,7 (valeur elle-même déjà supérieure au maximum atteint dans le cas du système purifié supplémenté en Sac6). Le simple mutant n'atteint cependant jamais 80% de déformation résiduelle, même avec 1µM de Sac6. L'ajout de protéine de réticulation n'a donc presque pas d'effet sur la plasticité dans le cas où Scp1 est présent dans le système.

Ces résultats ne sont cependant que préliminaires à cause du faible nombre de points de mesure résultants d'une seule expérience par point pour le double mutant. Le mutant  $sac6\Delta$  totalise bien les 3 journées d'expérience indépendantes par point de mesure requises pour la gamme de concentrations [50;250 nM], mais le nombre de points de mesure est faible car les gels ne poussent pas bien dans ces conditions.



FIGURE 5.9 – Évolution de l'hystérèse avec addition de Sac6 purifié. Cercles : points de mesure pour les expériences de supplémentation, carrés : moyennes et barres d'erreur; bleu : mutant sac6Δ, vert : mutant sac6Δ scp1Δ, gris : système de protéines purifiées; ligne pointillée : valeur moyenne pour l'extrait de type "sauvage", noté WT.

On a vu pour le système purifié que quand la concentration de Sac6 est du même ordre de grandeur que la concentration en actine, les gels poussent très mal. Or dans cette expérience aussi, les réseaux se développent mal. On peut donc se demander si cela n'est pas dû, d'une part, à la présence d'autres protéines de réticulation de l'actine dans milieu, dont les concentrations additionnées avec celle de la protéine Sac6 ajoutées pourraient générer une situation de déséquilibre du rapport actine sur CL. De plus, des problèmes se présentent dès l'addition de 50 nM de Sac6, donc on peut se demander si la concentration de CL dans l'extrait n'est pas déjà élevée à cause de phénomènes de sur-expression de certaines protéines (comme Scp1) en compensation de l'absence de Sac6 ([Gheorghe et al. J. Biol. Chem. 2008]). Une autre cause possible des difficultés de croissance des gels serait expérimentale : une dilution excessive de l'extrait lors de l'ajout des protéines purifiées nuirait au développement des gels. Cependant comme nous avons pris la précaution d'utiliser des solutions de protéines Sac6 très concentrées et comme, dans la majorité des cas, il a été possible de diminuer l'ajout d'autres composants (actine marquée, volume de billes) pour compenser, cette cause est peu probable.

La sur-expression d'autres protéines de réticulation ([Gheorghe et al. J. Biol. Chem. 2008]) ayant un effet sur les propriétés mécaniques différent de Sac6 (et une compétition pour la décoration des filaments d'actine), permettrait peut-être d'expliquer pourquoi il faut une concentration de Sac6 quatre fois supérieure à celle mesurée dans les levures pour retrouver le module élastique du réseaux issu de l'extrait sauvage.

L'ajout de Sac6, dans le système de protéines purifiées ou dans les extraits, a le même effet : une augmentation du module de Young et de l'hystérèse. Le module élastique des réseaux assemblés à partir des extraits sans Sac6 est plus faible que celui de la souche sauvage, et les résultats obtenus par ajout de Sac6 sont en accord avec les résultats dans le système purifié et sur les différents extraits. En revanche, l'hystérèse se comporte de façon opposée : l'ajout de Sac6 conduit à une augmentation de l'hystérèse dans le système purifié et l'absence de Sac6 dans les extraits mutants conduit aussi à une hystérèse augmentée par rapport à la souche sauvage. Un extrait sans sac6 supplémenté en sac6 ne se comporte pas de la même façon qu'un extrait sauvage. Les autres protéines de réticulation jouent probablement un rôle prépondérant dans ces phénomènes.

#### 5.5 Résumé des résultats

La mesure de l'hystérésis et du module d'Young nous a permis de mettre en évidence des propriétés spécifiques de chacune des trois protéines de réticulations étudiées : Sac6, Scp1 et Abp140. Nous disposons d'éléments nous permettant de préciser leur rôle dans la mécanique des réseaux.

Sac6 a un effet prépondérant sur l'élasticité des réseaux. Dans la comparaison des extraits mutants, l'absence de Sac6 a toujours beaucoup d'impact sur le module d'Young mesuré et les autres peu ou pas. Abp140 semble avoir un rôle de rigidification des réseaux en l'absence de Sac6, mais son effet est totalement masqué par la présence de Sac6 dans les réseaux. Ceci est confirmé par l'évolution de la réponse élastique des gels de protéines purifiées ou de mutants pour lesquels Sac6 est absent lorsque Sac6 est ajouté à la solution. Scp1 ne semble pas avoir de rôle sur la mécanique des réseaux à une échelle de temps de 10 secondes. En revanche une contribution à l'élasticité est détectée avec des rampes de 1,5 s. La dynamique de Scp1 est donc inférieure à 10 secondes.

Par ailleurs Scp1 semble avoir un impact particulièrement fort sur l'hystérèse : en présence de Scp1, les réseaux sont très hystérétiques, en particulier si Sac6 est absent. Un effet visqueux sur les gels lors d'une sollicitation en 15 s dû à une dynamique rapide de ce CL (inférieure à 10 s) pourrait expliquer cette influence importante sur la plasticité. Abp140 semble également jouer un petit rôle sur la plasticité qui apparait dans les extrait  $sac6\Delta \ scp1\Delta$  ainsi que dans la perte d'hystérèse de l'extrait  $abp140\Delta$ . L'ajout de Sac6 augmente l'hystérèse, de même que l'absence de Sac6 dans les mutants. Cet effet contradictoire n'est pas encore expliqué, mais montre que le mutant  $sac6\Delta$  n'est pas simplement un type sauvage dont on a enlevé la protéine Sac6.

#### 5.6 Discussion

Nous discuterons dans cette partie des résultats obtenus au cours de notre l'étude sur Sac6, Scp1 et Abp140.

Sac 6 et Scp1 coopèrent dans leur rôle d'organisation du cytosquelette d'actine. Elles ont une partie de leurs fonctions en commun et sont par ailleurs en compétition pour la liaison aux filaments d'actine [Goodman et al., 2003].

Abp140 est une protéine de réticulation de l'actine que l'on retrouve dans les patchs d'endocytose et au sein des câbles d'actine [Asakura et al. 1998]. A ce jour aucune étude n'a montré d'altération de la dynamique ou de l'organisation de l'actine due à son absence, c'est pourquoi elle est considérée comme ayant une fonction de réticulation du réseau redondante avec celle de Sac6 et Scp1 [Goode et al., 2015].

## Les mutants pour Sac6 et Scp1 exhibent les mêmes altérations que les patchs in vivo en termes de dimensions

Les réseaux d'actine branchés reconstitués in vitro autour de billes à partir d'extraits cellulaires de levure de différentes souches présentent des épaisseurs moyennes différentes en fonction des protéines présentent dans les réseaux. Le type sauvage présente une épaisseur moyenne de 287+/-105nm, du même ordre de grandeur qu'un mutant  $scp1\Delta$  (218+/-90nm), alors qu'un mutant sac6 $\Delta$  présente des réseaux beaucoup plus épais (486+/-211nm), et un double mutant  $sac6\Delta scp1\Delta$  des réseaux encore plus épais (523+/-197nm). Or, il a été observé une évolution similaire des dimensions des patchs endocytiques (208 et 210 nm de diamètre pour le type sauvage et le mutant  $scp1\Delta$  respectivement, 305 nm pour  $sac6\Delta$ , et enfin 415 nm pour  $sac6\Delta scp1\Delta$ ), [Gheorghe et al. 2008]). Les différentes protéines d'une même famille n'ont pas nécessairement le même impact sur l'architecture des réseaux. Un réseau d'actine poussant autour d'une bille peut atteindre une épaisseur constante à cause des contraintes mécaniques se développant au sein du réseau [Noireaux Biophys J 2000]. L'actine polymérisant autour de la surface de la bille, là où Arp2/3 est activée, elle repousse le réseau plus ancien en périphérie ce qui provoque une contrainte radiale dirigée vers la surface de la bille, qui peut empêcher les filaments de polymériser. Selon le modèle développé par Noireaux et al., l'épaisseur alors atteinte dépend du module élastique à la puissance -1/2. On constate qualitativement que ce sont effectivement les types de réseau les plus mous  $(sac6\Delta et sac6\Delta scp1\Delta))$  qui atteignent les plus fortes épaisseurs. Un patch d'actine n'a pas la même géométrie qu'un réseau polymérisant depuis une bille et le lien entre épaisseur et diamètre n'est pas direct, mais la variation très similaire de leurs dimensions en fonction du type d'extrait pourrait indiquer que ce sont les mêmes phénomènes de contraintes internes qui limitent le diamètre des patchs d'endocytose.

#### Les doubles mutants sont plus affectés que les simples mutants

Que ce soit en termes de dimension, d'élasticité ou de plasticité, les réseaux reconstitués à partir de doubles mutants présentent en général des caractéristiques plus éloignées du type sauvage que les mutants simples. Par exemple,  $sac6\Delta abp140\Delta$  est significativement plus mou que  $sac6\Delta$  (module d'Young à 2500 Pa contre 3600 Pa) alors que  $abp140\Delta$  n'est pas significativement différent du type sauvage (6200 Pa). De même les gels les plus épais en moyenne sont les doubles mutants,  $sac6\Delta scp1\Delta$  avec 523+/-197nm et  $sac6\Delta abp140\Delta$  avec 646+/-180nm, alors que les gels  $sac6\Delta$  ont une épaisseur autour de 486 nm et ni l'épaisseur de  $scp1\Delta$  ni celle de  $abp140\Delta$ ne varient par rapport au type sauvage. In vivo ce phénomène apparait aussi concernant le taux d'endocytose (défini comme le pourcentage des patchs pouvant entrer dans la phase de déplacement rapide) : seuls 40% des patchs endocytiques s'invaginent sur plus de 250 nm à l'intérieur de la cellule pour le mutant  $sac6\Delta$ , contre plus de 70% chez le type sauvage, tandis que le mutant  $scp1\Delta$  ne présente pas de variation significative du taux d'endocytose. Le double mutant  $sac6\Delta scp1\Delta$  en revanche, est beaucoup plus malade que le simple mutant  $sac6\Delta$ , avec seulement 10% des patchs endocytiques qui s'invaginent sur plus de 250 nm à l'intérieur de la cellule [Gheorghe et al. 2008]. Ce phénomène peut avoir plusieurs explications. Il peut s'agir d'un « sauvetage du phénotype » où l'une ou plusieurs des protéines de réticulation serait génétiquement surexprimées ([Gheorghe et al. 2008]). Il peut s'agir également d'un effet de compétition biochimique qui permettrait aux autres protéines de réticulation de se lier à l'actine plus fréquemment quand Sac6 n'est pas présente ([Skau et Kovar 2010]). Enfin, mécaniquement, si les liens entre filaments d'actine dûs à la protéine sac6 sont plus rigides que ceux des autres protéines de réticulations, ces derniers peuvent être peu sollicités tant que Sac6 est présente.

#### Les réponses mécaniques des mutants mettent en évidence différents rôles des protéines de réticulation

Les mesures du module élastique et de l'hystérèse montrent bien que les trois protéines de réticulation étudiées ici n'ont pas le même effet sur la mécanique des réseaux. cela peut être dû à des effets biochimique (différence de concentration entrainant une différence d'affinité pour l'actine par exemple) ou être la signature d'une caractéristique mécanique. Par exemple, le mutant  $sac6\Delta$  présente un module d'Young très inférieur à celui du type sauvage. Des modèles prévoient une dépendance linéaire du module élastique du réseau avec la longueur de persitance du filament [Pujol et al. PNAS 2012]. Or il a été montré chez les mammifères que la liaison de calponine à l'actine affecte sa longueur de persistance, la faisant passer de  $8\mu$ m à  $5,8\mu$ m [Jensen et al. Cytoskeleton 2012]. Si Scp1 affectait de la même manière la longueur de persistance de l'actine de levure, cela pourrait expliquer une baisse du module élastique pour les mutants  $sac6\Delta$  et  $sac6\Delta abp140\Delta$ .

#### Sac6 joue un rôle essentiel dans la formation d'un réseau rigide

L'endocytose requiert l'invagination de la membrane plasmique, ce qui, pour des cellules turgescentes comme les levures [Basu et al. 2014], nécessite le développement de forces importantes. L'architecture des réseaux d'actine sur les sites d'endocytose permet de rendre des forces produites à l'échelle moléculaire (par exemple la poussée due à la croissance d'un filament d'actine) utiles à l'échelle de la cellule. L'organisation des réseaux permet d'amplifier les forces produites, et, dans le cas des sites d'endocytose, de produire des forces orthogonales à la direction de croissance des réseaux. Les éléments tels que les protéines de réticulation transmettent ces forces au travers du réseau et permettent de générer une "base" rigide sur laquelle s'appuient les filaments en croissance pour pousser leur charge [Dmitrieff et Nédélec, 2016]. Il a été proposé que Sac6 est essentielle à la construction de tels réseaux [Kaksonen et al. 2005, Gheorghe et al. 2008]. Nos résultats montrent bien que l'addition de Sac6 à un réseau sans protéine de réticulation ou dans un extrait dont Sac6 est absent les rigidifie et l'absence de Sac6 dans un mutant cause une baisse importante du module élastique par rapport au type sauvage. Une explication proposée à cette prédominance de Sac6 sur les autres protéines de réticulation de l'actine est celle d'une compétition de la liaison à l'actine, que Sac6 gagnerait car sa concentration molaire relative à celle des autres CL serait élevée. In vivo  $\sim 65:6:1$  a été mesuré pour le ratio d'actine, Sac6 et Scp1 [Goodman et al. 2003]. Une autre explication serait celle avancée au paragraphe précédent : si les points de réticulation générés par Sac6 sont plus rigides que ceux générés par les autres CL, ils sont les principaux contributeurs à la rigidité des réseaux.

#### Scp1 joue un rôle important dans la plasticité des réseaux

La mesure de l'hystérésis, si elle confirme un rôle prédominant de Sac6 dans les réseaux (augmentation forte de l'hystérèse du mutant  $sac6\Delta$  par rapport au type sauvage), met en relief le rôle de Scp1 sur la plasticité. Les mutants où Sac6 est absente mais Scp1 présente exhibent

une très forte plasticité par rapport au type sauvage, tandis que les mutants où Scp1 est absente voient leur plasticité changer très peu. Si la dynamique de liaison à l'actine de Scp1 est plus rapide que celle de Sac6, comme le laisse supposer les résultats sur le changement de pente de la rampe de force (discutés dans le paragraphe ci-après), on peut expliquer ce résultat sur l'hystérèse par la possibilité que Scp1 se détache pendant la sollicitation et se rattache en un point différent du réseau déformé, ce qui génèrerait de la plasticité.

#### La dynamique de la sollicitation change la réponse des réseaux

Si la sollicitation est réalisée à grande vitesse (en 1,5 s au lieu de 15,15 s), alors Scp1 joue également un rôle dans l'élasticité. Nous déduisons de l'augmentation du module d'Young dans le type sauvage et le mutant  $sac6\Delta$  en cas d'augmentation de la vitesse de sollicitation que la dynamique d'interaction de Scp1 avec l'actine est inférieure à 15 s. Or la construction du patch endocytique et surtout la première phase d'invagination (avant scission) se font en une quinzaine puis une dizaine de secondes respectivement [Weinberg et Drubin, 2012], soit précisément les échelles de temps sur lesquelles la contribution de Scp1 à l'élasticité est susceptible de changer. La réalisation de mesures du taux de dissociation de Scp1  $k_{off}$  permettrait de déterminer plus précisément la dynamique de Scp1. La variabilité de la réponse des CL en fonction du type de sollicitation pourrait constituer, pour la cellule, un mécanisme d'adaptation automatique aux caractéristiques mécaniques du milieu.

Remarquons ici que l'hystérèse des réseaux où Scp1 est présente n'est pas altérée par l'augmentation de la vitesse de sollicitation alors que celle du double mutant  $sac6\Delta scp1\Delta$  l'est. Pour le type sauvage cela s'explique par la présence de Sac6 dans les réseaux. A vitesse de sollicitation forte comme c'est le cas ici (charge en 0,75 s), les effets visqueux peuvent devenir plus sensibles. Ceci expliqueraient l'augmentation de l'hystérèse pour le double mutant, qui possède moins de points de réticulation que les deux autres extraits testés. De tels effet pourraient également expliquer le résultat assez surprenant sur l'hystérèse de  $sac6\Delta$ , qui ne diminue pas lors du changement de vitesse de sollicitation. Si les points de réticulation générés par Scp1 sont moins rigides que ceux générés par Sac6, ou si l'absence de Sac6 n'est pas totalement compensée par les autres protéines de réticulation, alors l'extrait  $sac6\Delta$  est lui aussi plus sensible à d'éventuels effets visqueux que le type sauvage.

#### La temporalité de l'incorporation des ABPs dans les réseaux joue un rôle fondamental sur les propriétés exprimées

In vivo, Sac6 colocalise avec les patchs endocytiques jusqu'au début de la phase rapide d'internalisation (après scission). Scp1, elle, est détectée dans les patchs plus tardivement que Sac6 et y reste pendant la phase rapide d'invagination [Gheorghe et al. 2008]. Il y aurait donc une évolution de la mécanique des réseaux branchés d'actine de réseaux très rigides et plastiques pendant l'invagination initiale à faible rayon courbure, où il est besoin de générer de la force pour vaincre la pression de turgescence et démarrer l'invagination, à des réseaux moins rigides et beaucoup plus plastiques pendant la phase de mouvement rapide des vésicules d'endocytose (post-scission).

Ce constat soulève la question de l'origine de cette modification de la composition des réseaux et de leur mécanique. Est-ce la conséquence d'un signal biochimique ou d'un signal mécanique ? Y-a-t'il un changement de protéine de réticulation pour pouvoir accommoder les déformations nécessaires à la formation de la vésicule d'endocytose ou, au contraire, est-ce la contrainte accumulée dans les réseaux lors de la formation de la vésicule qui force les protéines Sac6 à se détacher, libérant la place pour Scp1?

#### Par comparaison avec les autres mutants certaines propriétés de Abp140 peuvent être déterminées

Le fait que  $abp140\Delta$  ait une épaisseur de 214+/-58nm, comme le type sauvage et  $scp1\Delta$ , de même que le fait que l'élasticité des réseaux  $abp140\Delta$  soit la même que celle du type sauvage est consistant avec fait que la capacité à réaliser l'endocytose de  $abp140\Delta$  ne semble pas affecté par l'absence de Abp140. De même, l'épaisseur moyenne des réseaux obtenus pour  $sac6\Delta abp140\Delta$ est plus élevée que celle obtenue pour  $sac6\Delta$ , et le module d'Young plus faible pour le double mutant que pour  $sac6\Delta$  semblent confirmer l'hypothèse d'une fonction de Abp140 redondante de celle de Sac6.

Cependant ici encore la mesure de l'hystérèse permet de jeter une nouvelle lumière sur la fonction de cette protéine. Le mutant  $abp140\Delta$  présente une hystérèse moindre que le type sauvage. Cela nous renseigne sur le fait que comme Scp1, Abp140 joue un rôle sur la plasticité des réseaux. Cet effet sur le simple mutant montre que Abp140 participe à la plasticité des réseaux mesurée chez le type sauvage, en présence de Sac6 comme de Scp1. La fonction de Abp140 n'est donc pas redondante avec celle de Sac6 et de Scp1 en ce qui concerne la plasticité.

### Chapitre 6

# Etudes des autres grandes familles : résultats préliminaires

Dans le chapitre précédent nous avons étudié le rôle des protéines de réticulation sur la mécanique des réseaux branchés. Au cours de cette thèse nous avons également réalisé quelques mesures préliminaires sur des représentants des autres grandes familles de protéines de liaisons à l'actine impliquées dans la machinerie Arp2/3. Ces résultats sont présentés dans les sections ci-dessous.

Nous allons tout d'abord présenter les résultats de mesures effectuées sur le système de protéines purifiées, pour différentes concentrations d'actine, d'Arp2/3 et de CP. Nous nous intéresserons ensuite au rôle d'Arp2/3 de levure dans la faible rigidité des réseaux branchés obtenus à partir d'un mélange de quatre protéines en comparant son rôle sur l'élasticité et la plasticité à celui de la protéine mammifère. Les résultats obtenus sur la CP seront eux comparés aux mesures réalisées sur un mutant  $cap2\Delta$  (qui n'exprime pas la protéine Cap2). Dans un second temps nous analyserons les résultats des mesures réalisées sur le mutant  $aip1\Delta$ . Il est possible de les comparer aux réponses obtenues sur un système de protéines mammifères auquel est ajouté de l'ADF. Enfin nous comparerons les résultats des sollicitations en fréquence sur un mutant pour chaque grande famille : l'extrait de type sauvage, le mutant  $sac6/scp1\Delta$ , le mutant  $aip1\Delta$ , et quelques points de mesures pour le mutant  $cap2\Delta$ . Tous ces résultats sont des résultats préliminaires, soit par leur faible puissance statistique, soit par le nombre restreint de conditions testées.

#### 6.1 Effet de l'Arp2/3 et des protéines de coiffes

#### 6.1.1 Système de protéines purifiées de la levure

Ce paragraphe est l'occasion de présenter quelques résultats sur le système minimal de quatre protéines (Arp2/3, actine, protéine de coiffe et profiline) ayant précédé le choix des concentrations sur lesquelles j'ai finalement travaillé, et dont les résultats sont présentés au chapitre 4 et 5.



FIGURE 6.1 – Schéma des conditions pour quelques expériences de variation des concentrations protéiques dans les réseaux reconstitués à partir de protéines purifiées. Plus une zone est dessinée de couleur foncée plus l'information qu'elle contient est fiable (nombre satisfaisant de points de mesure et/ou petites barres d'erreur); estimation de E calculée avec un fit à 1000pN.

Le tableau ci-dessous rassemble les résultats des rampes de forces réalisées sur 2 à 80 mT en champ magnétique :

fit sur 1000pN	[Arp2/3]:	10 nM	25  nM	50  nM
[Actine] :	[Protéines de coiffe] = 200 nM		[Protéines de coiffe] = 400 nM	
				Gels brisés
	Module	E=1240Pa [990;1550]	E=1000Pa [910;1090]	E=900Pa [810;1010]
$1,2~\mu{\rm M}$	Hysteresis	Hystn=0,37+/-0,02	Hystn=0,40+/-0,02	Hystn=0,31+/-0,02
	h0	640+/-130nm	470+/-40nm	690+/-80nm
	Statistique	5 points	45 points	12 points
	Module			E=730Pa [660;820]
$3~\mu { m M}$	Hysteresis			Hystn=0,39+/-0,03
	h0			630+/-65nm
	Statistique			18 points
	Module	E=1020Pa [960;1080]		E=500Pa [480;530]
$6 \ \mu M$	Hysteresis	Hystn=0,36+/-0,01		Hystn=0,46+/-0,01
	h0	220+/-10nm		690+/-40nm
	Statistique	37 points		62 points

Tout en restant du même ordre de grandeur (l'élasticité varie au maximum de 500 Pa à 1200 Pa pour les gammes de concentrations présentées sur la figure 6.1 et le tableau 6.1.1 ci-dessus), plusieurs tendances ressortent pour le module de Young : pour une concentration d'actine de 6  $\mu$ M et de protéines de coiffe de 200 nM, l'élasticité des réseaux diminue avec l'augmentation du nombre de branchement (E divisé par 2 pour un concentration en Arp2/3 multipliée par 5), et ce dans une gamme de concentrations faibles devant la concentration en actine (deux ordres de grandeur plus faible). Dans cette configuration la plasticité, elle, augmente quand la concentration en protéine de branchement. La plasticité augmente également quand la concentration en actine augmente (ratio  $\frac{[actine]}{[Arp2/3]}$  passant de 24 à 120), ce qui peut être dû à un changement de la dynamique d'assemblage des gels lorsque l'on passe à des concentrations d'actine fortes. Enfin, lorsque à la concentration d'actine de 1,2  $\mu$ M et d'Arp2/3 de 50 nM, on augmente la concentration de CP et de 200 à 400 nM, on observe un grand nombre de brisures de symétrie dans le gel, et de comètes d'actines. La brisure de symétrie nous empêche de mesurer la mécanique de ces gels, car le contact n'est plus sphérique, et on ne peut remonter au module de Young en utilisant les relations de Hertz (cf chapitre 3). L'augmentation de la brisure avec la concentration des protéines de coiffes a déjà été observée et est expliquée par la baisse de la longueur moyenne des filaments et l'augmentation de la taille des défauts dans le réseau ([van der Gucht et al., 2005]).

Remarquons qu'ici non plus aucune configuration ne présente d'hystérèse nulle, alors qu'aucune protéine de réticulation ni de désassemblage n'est présente dans le réseau (comme cela a été discuté au paragraphe 4.4.1). Par ailleurs dans les conditions testées la plasticité reste très faible en comparaison avec l'hystérèse mesurée sur les extraits cellulaires.

La diminution du module élastique avec l'augmentation de la concentration en Arp2/3 est un résultat contre-intuitif et surprenant au vue des résultats de mesures similaires sur un système de protéines mammifère qui montraient la tendance inverse ([Pujol, du Roure, Fermigier, and Heuvingh, 2012]). Cependant 6  $\mu$ M d'actine G représente une concentration très élevée, à laquelle on peut s'attendre à voir apparaître des effets non voulus (par exemple des défauts d'assemblages des gels), donc ce résultat serait à vérifier avec d'autres concentrations d'actine.

#### 6.1.2 Arp2/3 de levure : effet sur réseaux d'actine de levure et de mammifère

Les modules élastique des réseaux reconstitués à partir des protéines de levure sont beaucoup plus mous que les réseaux reconstitués à partir de protéines de mammifères qui avaient été mesurés par Tomas Pujol pendant sa thèse. Cependant le protocole de reconstitution était différent, car T. Pujol utilisait de l'actine déjà polymérisée sous forme de filament, et une protéine de dépolymérisation (ADF) afin d'avoir un réservoir d'actine monomérique ([Bernheim-Groswasser Nature 2002]). Pour vérifier que cette différence de protocole n'était pas responsable d'une différence d'architecture et donc de mécanique, j'ai effectué des mesures sur des réseaux reconstitués avec des protéines de mammifère et un protocole utilisant l'actine G et aucune ADF. Les résultats pour les concentrations des différentes protéines : [Gelsoline]=100nM; [Actine]globulaire= $1\mu$ M; [ATP]=1.9mM; [Arp2/3]=100nM, sont très similaire aux résultats de Thomas Pujol. Le module est d'environ 5500 Pa (avec un fit sur 800 pN), tandis que pour le système de protéines purifiées de levure ([CP]=400nM;  $[Actine]globulaire=1,2\mu M$ ;  $[Profiline]=3,6\mu M$ ; [Arp2/3]=25nM), le module d'Young vaut environ 1 kPa. On mesure par ailleurs une hystérèse de 0.50 + -0.03 sur ces réseaux de protéines mammifère, ce qui est supérieur à l'hystérèse du système de protéines purifiées de levure (env. 0,4), mais surtout, très différent des observations réalisées par T. Pujol. Il n'observait quasiment aucune hystérèse, mais ses réseaux étaient fixés par de la phalloïdine, qui, comme nous l'avons vu au chapitre 4, a un fort impact sur la plasticité.

Ceci confirme que le réseaux d'actine de levure sont plus mous que ceux d'actine de mammifère. Cette différence peut s'expliquer en partie par la plus grande flexibilité des filaments d'actine de levure dont la longueur de persistance a été mesuré à 7 +- 0.5  $\mu$ m au lieu de 9.5 +- 0.5  $\mu$ m pour l'actine mammifère ([Kang et al., 2014]). Quantitativement cependant, les modèles de réseaux de filaments prévoient une dépendance linéaire du module élastique du réseau avec la longueur de persistance du filament ([Pujol et al., 2012]), et la flexibilité supérieure des filaments d'actine de levure ne pourrait donc pas expliquer toute la différence de mesure mécanique.

Pour identifier d'autres sources de cette différence, j'ai intégré l'Arp 2/3 de levure au système mammifère décrit ci-dessus. En utilisant soit des billes fonctionnalisées avec le fragment peptidique VCA (comme dans les expériences de mammifères) soit avec Las 17. Dans le premier cas, j'ai obtenu trop peu de courbes valides pour une analyse quantitative, mais les résultats du second cas sont montrés dans le tableau ci-dessous.

fit sur 800pN	$[\mathrm{Arp}2/3]_M = 100nM$	$[\operatorname{Arp}2/3]_L = 100nM$
	billes VCA	billes La17
	3 journées d'expérience	1 journée d'expérience
		80% des gels brisés
Module	E=5390Pa [4700;6190]	$E_{\rm App} = 320 \text{Pa} [290; 360]$
Statistique	22 points	51 points
Hysteresis	Hystn=0,50+/-0,03	Hystn=0,28+/-0,02
Statistique	15  points	33  points
h0	520+/-44nm	690+/-50nm

Entre le système complet mammifère et celui ou seul Arp2/3 et son activateur sont remplacés par leurs homologues en levure, le module élastique est divisé par un facteur supérieur à 10!

Les réseaux formés sont également plus épais que ceux du cas 100% mammifère et semblent asymétriques. Ceci est souvent le signe d'une brisure de symétrie dans les réseaux, ce qui amoindrit la confiance qu'on peut accorder à ces mesures. Si elles étaient confirmées, elles pourraient cependant signifier que Arp2/3 de levure est beaucoup plus flexible qu'Arp2/3 de mammifère, et que la différence de mécanique n'est pas due aux filaments mais à aux branches des réseaux. On ne peut cependant pas exclure que ce soit l'hétérogénéité du système entre Arp2/3 levure et actine mammifère qui est responsable de cette plus grande flexibilité, ou d'une plus faible activité d'Arp2/3 qui change la dynamique de construction et la structure du réseau branché.

La figure 6.2 présente une courbe typique pour chacun de trois cas étudiés.



FIGURE 6.2 – Courbes force-distance caractéristiques de réponse à un rampe de force pour un même système de protéines purifiées de mammifère avec, de gauche à droite, Arp2/3 de mammifère activée par VCA, Arp2/3 de levure activée par VCA, Arp2/3 de levure activée par Las17. La figure de gauche correspond à la case de gauche du tableau, la figure de droite à la case de droite du tableau. La figure centrale présente une courbe obtenue avec Arp2/3 de levure activée par VCA, une protéine mammifère. Les gels obtenus dans ce cas (mauvais activateur d'Arp2/3) ne sont pas bien fittées et nous ne disposons pas de mesures guantitatives.

#### 6.1.3 Extraits mutants où CP manque

Les deux sous-unités de la protéine de coiffe de la levure, Cap1 et Cap 2, sont nécessaires à l'activité de coiffe de CP [Amatruda et al. 1992]. Une mutation sur l'une de ces sous-unité suffit à générer un mutant où CP n'est pas fonctionnelle : nous travaillons ici avec  $cap2\Delta$ . Nous avons pu réalisé deux expériences préliminaires sur ce mutant.

Avec des épaisseurs avant sollicitation variant de la centaine de nanomètres à plus d'un micromètre, les gels subissent des indentations de l'ordre de 50% de leur épaisseur et présentent pour beaucoup un "décrochage" aux basses forces au début de la courbe. Le fit n'arrive pas bien à suivre les courbes d'écrasement. Ainsi trop peu points sont correctement fités sur 900pN (sur 24 courbes analysées). Ce n'est pas suffisant pour déterminer la valeur du module élastique ni de l'hystérèse de ces réseaux, mais on peut tout de même noter l'extrême faiblesse des modules élastiques obtenus sur ces quelques points, inférieurs à 1000 Pa. L'hystérèse apparaît elle très importante, supérieure à celle du type sauvage.

Les protéines de coiffes limitent la croissance des filaments loin de la surface, ce qui favorise la formation de nouvelles branches par Arp2/3. En absence de CP, les réseaux reconstitués sont donc moins réticulés et ressemblent plutôt à de longs filaments partant radialement de la surface ([Vignjevic et al., 2006]). La diminution drastique du module élastique que nous observons (qualitativement) n'est donc pas surprenante. Il a été observé que le mutant  $cap2\Delta$ peut réaliser l'endocytose, mais avec un mouvement ralenti des patchs endocytiques [Kaksonen et al. 2005]. Cependant une autre étude trouve que la vitesse des patchs d'actine *in vivo* est inchangée entre un mutant où CP est absente et un type sauvage ([Kim et al., 2004]). Enfin une dernière étude mesure des vitesses inchangées *in vivo* et une baisse de la vitesse de déplacement de billes plongées dans l'extrait cellulaire, *in vitro* ([Michelot et al., 2013]). Les auteurs concluent que CP n'est pas nécessaire pour le renouvellement rapide des réseaux d'actine branchés, mais est requise pour le développement d'une force normale *in vitro*. Le ramollissement que nous semblons observer, *in vitro*, pourrait-il être corrélé avec une baisse de la capacité de ces réseaux à générer des forces ?

#### 6.2 Protéines de désassemblage : Aip1 et cofiline

Des mutations touchant directement à la cofiline sont létales. Nous avons donc travaillé sur un extrait mutant pour l'un des cofacteur de la cofiline, Aip1 ([Michelot et al. 2013], [Gressin et al. 2015]).

#### Mesure du module d'Young et de l'hystérèse



Comparaison du mutant Aip1 null avec le type sauvage

FIGURE 6.3 – Mesures du module élastique et de l'hystérèse pour l'extrait sauvage (en rouge) et l'extrait aip $1\Delta$  (en violet). Chaque cercle représente une mesure. Les carrés noirs pleins représentent les moyennes et sont accompagnés de barres d'erreur correspondants à l'erreur-type.

La réponse du mutant  $aip1\Delta$  à une rampe de force "classique" (2 à 80 mT en champ) de 15,15 s (fit sur 1000 pN) nous montre que ce mutant produit des réseaux plus mous que le type sauvage. L'hystérèse n'est pas significativement différente. Son module de Young est estimé à 3270 Pa, dans l'intervalle [3040;3510]. Cette valeur correspond aux modules d'Young mesurés pour les mutants  $sac6\Delta$  et  $sac6/scp1\Delta$ .

Si l'on se réfère au tableau des épaisseurs avant sollicitation moyennes des gels établi au chapitre 4 et à la discussion du chapitre 5, on voit que tous les mutants pour des protéines de réticulation et le type sauvage semblaient suivre au moins qualitativement le modèle de Noireaux et al. (2000) qui prédit l'épaisseur atteinte par un gel autour d'une bille en fonction de son module élastique. Les gels  $aip1\Delta$ , en revanche, ont une épaisseur moyenne de 260 nm (+/-100 nm), soit du même ordre de grandeur que le type sauvage ou les mutant  $abp140\Delta$  ou  $scp1\Delta$ , qui donnent tous les trois des gels rigides (env. 6000 Pa). Cette différence de phénotype n'est pas surprenante puisqu'avec ce mutant, c'est la dynamique d'assemblage et de désassemblage des gels qui est altérée, un phénomène différent des questions de contraintes internes sur lesquelles on s'attend à ce que les points de réticulation jouent.

# 6.3 Sinusoïdes : comparaison entre extraits mutants de chaque grande famille de partenaires de l'actine

L'étude de la réponse en fréquence permet généralement de séparer les composantes de la réponse élastique et visqueuse d'un système. La figure 6.4 présente l'évolution du déphasage entre déformation et sollicitation en fonction de la fréquence de sollicitation pour les extraits sauvage, mutant  $aip1\Delta$  et double mutant  $sac6/scp1\Delta$ . Je présente également sur cette figure une courbe (brune) qui correspond à un système d'actine branchée reconstitué à partir de protéines purifiées de mammifère (Actine, Arp2/3, cofiline, gelsoline - une protéine de coiffe -) en présence

de phalloïdine. Lorsque ces mesures ont été réalisées, nous ne disposions pas encore du système de protéines purifiées de levure.

Les réseaux présentent tous une forte dépendance en fréquence dans leur réponse mécanique. On observe deux phénomènes intéressants sur cette figure : d'une part une variation de la fréquence à partir de laquelle le déphasage augmente brutalement à haute fréquence; d'autre part la disparition du minimum de déphasage autour de 1 Hz pour le mutant  $sac6/scp1\Delta$  et les protéines purifiées.



FIGURE 6.4 – Comparaison de la réponse à une sollicitation sinusoïdale pour différents extraits.

Aux fortes fréquences, l'augmentation brutale du déphasage est signe d'un décrochage de la réponse par rapport à la sollicitation. Les phénomènes visqueux et de poroélasticité ne sont plus négligeables à ces fréquences. La poroélasticité est un modèle qui décrit la rhéologie d'un matériau biphasique constitué d'un tissu poreux solide baignant dans un fluide interstitiel. Ce modèle appliqué à la cellule décrit le cytoplasme comme le composite de l'ensemble cytosquelette, organelles et macromolécules "solide élastique" et du cytosol (le "fluide interstitiel") ([Moeendarbary et al., 2013],[Charras et al., 2009]). Une augmentation significative du module de perte a déjà été observée à haute fréquence pour des réseaux d'actine et Arp2/3 ([Chaudhuri et al. Nature 2007]) et pour réseaux d'actine réticulés moins denses [Lieleg et al. PRL 2008]. Ces dernières expériences, en rhéomètre, ont montré que cette augmentation du module de perte était dépendante de la viscosité du solvant [Lieleg et al. PRL 2008]. Dans nos expériences, le déphasage semble apparaitre plus à basse fréquence pour le mutant  $aip1\Delta$  que pour les réseaux sans CLs. Cette observation pourrait être due à un changement dans la taille de maille de notre réseau, qui augmenterait l'effet poroélastique ([Mahadevan Nature materials 2013]).

La disparition du minimum de déphasage semble plus intéressante : si une protéine de réticula-

tion peut se détacher et se rattacher aux filaments du réseau, on peut attendre une modification des paramètres viscoélastiques à une fréquence proche de la dynamique de détachement du CL ([Lieleg 2008]). Or ce sont précisément les deux réseaux qui ne contiennent pas de CL (outre Arp2/3) qui voient disparaitre le minimum de déphasage à haute fréquence. Les auteurs cités précédemment ([Lieleg et al. PRL 2008]) travaillant sur des réseaux moins denses et utilisant une CL avec une dynamique de détachement de 0.03 s-1 voient un minimum du module de perte (dépendant de la viscosité du solvant) autour de 1 Hz et un maximum autour de 0.03 Hz. Ce maximum disparait si le réseau est fixé chimiquement. L'augmentation à basse fréquence du déphasage dans nos deux réseaux comprenant des CL pourrait donc être due à des effets de détachement et de rattachement des CL, en particulier de Scp1 dont nous avons montré le caractère dynamique au chapitre 5.

Pour être plus quantitatifs sur cette mesure, il faudrait pouvoir mesurer indépendamment le module de perte et le module de conservation. Comme expliqué au chapitre 3, c'est impossible dans notre géométrie car nous ne connaissons pas l'évolution de la taille de zone de contact avec le temps. Ce problème disparait quand nous déformons un gel entre deux surfaces planes. Une partie de ma thèse a été consacrée à la transition vers ce nouveau système. Les protocoles envisagés et les résultats préliminaires de croissance autour des cylindres sont présenté dans le chapitre de perspectives.

### Chapitre 7

### Conclusion et perspectives

Nous avons pu, au cours de cette thèse, étudier la réponse mécanique de gels d'actine branchés reconstitués à partir d'extraits cellulaires de levure et de composition biochimique très proche des patchs endocytiques.

Notre comparaison de la mécanique de différents mutants où manquent des combinaisons de trois des protéines de réticulation de l'actine de levure, associée à l'établissement de courbes dose-réponse d'ajout d'une CL dans les systèmes de protéines purifiées nous a permis de confirmer l'importance des protéines de réticulation sur la mécanique, mais aussi de faire apparaître des différences conséquentes dans leur participation à la rigidification des réseaux, avec une prépondérance marquée de Sac6.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une plasticité des réseaux encore peu démontrée et discutée dans les études précédentes. De plus cette plasticité semble faire partie intégrante du sytème "actine-arp2/3", car même en l'absence de toute CL ou de protéines de désassemblage, la plasticité apparait au sein de réseaux branchés d'actine de levure comme d'actine de mammifère. Les ABPs influencent cependant cette plasticité, et nous avons pu mettre en évidence, grâce à la combinaison de la mesure de plusieurs paramètres, un rôle important de Scp1 dans la plasticité des réseaux d'actine branchés. En l'absence de Sac6, Scp1 génère une forte plasticité des réseaux. L'hypothèse selon laquelle cette plasticité serait due à une dynamique de Scp1 plus rapide que la durée de sollicitation, qui permettrait à la protéine de se détacher et se rattacher ailleurs dans le réseau pendant la déformation, semble confirmée par les mesures de l'élasticité conduite à une vitesse de sollicitation plus importante.

L'ajout de Sac6 dans un système minimal constitué d'actine, d'arp2/3, de CP et de profiline suffit à restaurer un phénotype sauvage pour l'élasticité et la plasticité, même si cela nécessite des concentrations de Sac6 beaucoup plus élevées que celles mesurées dans la cellule. Réaliser la même expérience de dosage avec Scp1 nous permettrait de confirmer la différence de rôle sur la mécanique. D'après les résultats obtenus à ce stade, on attendrait une augmentation très importante de la plasticité des réseaux, pour des concentrations beaucoup plus faibles que celles de Sac6.

D'une manière générale, chaque protéine testée a affecté la mécanique du réseau d'une manière plus ou moins marquée. Abp140, prédite redondante de Sac6 et Scp1 pour sa fonction dans les patchs endocytiques montre pourtant un rôle sur la plasticité des réseaux. L'absence d'Aip1, protéine de la famille des protéines de désassemblage, n'a pas d'effet sur la plasticité mais provoque une importante baisse de l'élasticité. La combinaison de plusieurs types de sollicitations mécanique et l'analyse de plusieurs paramètres différents permet de faire apparaitre des comportements parfois non intuitifs, et de discriminer entre les rôles de protéines de fonction pourtant proche. Un objectif de développement futur de ce système serait de collecter suffisamment d'informations et de mettre en place un panel de tests suffisamment riche pour établir une carte des propriétés mécaniques qui permettrait de déterminer la fonction mécanique d'une protéine simplement en testant son effet sur a mécanique et la dynamique des réseaux. Il serait alors possible d'étudier les nombreuses protéines que l'on trouve dans les gels branchés d'extraits cellulaires de levure reconstitués à partir de Las17 (détectées au nombre de 90) dont le rôle demeure souvent encore totalement inconnu.

Enfin, bien que le cytosquelette d'actine soit en général très conservé dans l'évolution, et bien que les protéines de levure des réseaux branchés étudiées ici possèdent un homologue dans les cellules mammifères, leurs rôles ne sont pas nécessairement équivalents. Par exemple l'Arp2/3 de levure, si elle est utilisée en remplacement de l'Arp2/3 de mammifère dans un système de protéines purifiées de mammifère, semble causer une diminution drastique de l'élasticité des gels qui, si elle était confirmée (réalisation de séries de mesures supplémentaires, et élimination des hypothèses d'une activité plus faible d'Arp2/3 qui change la dynamique de construction et la structure du réseau branché ou d'un problème de "compatibilité" d'Arp2/3 de levure avec l'actine de mammifère), pourrait signifier que Arp2/3 de levure est beaucoup plus flexible qu'Arp2/3 de mammifère. Cet effet intéressant, combiné à une évolution contre-intuitive et inattendue de l'élasticité de gels de protéines purifiées de levure avec l'augmentation de la dose d'Arp2/3 inciterait à étudier la contribution des branchements à la mécanique globale des réseaux d'actine branchés.

Cette première étude de quelques composants d'un système très complexe n'a été rendue possible que grâce à la combinaison de deux outils très puissants : un système de mesure de la mécanique de réseaux haut débit, avec une grande précision de mesure et un large panel de types de sollicitations mécaniques, et les techniques de génétique de pointe donnant accès à un nombre quasi illimité de combinaisons de mutations dans les souches de levure ainsi que la possibilité de purifier des protéines d'intérêt pour les étudier.

#### 7.1 Tests sur colloïdes "plats"

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises dans ce manuscrit, la géométrie de contact de notre système (entre deux sphères) limite les paramètres mécaniques que l'on peut en extraire. En effet, nos réseaux étant plastiques, une fois la première déformation effectuée nous perdons l'information sur la taille de zone de contact. Ceci nous empêche de mesurer l'évolution des paramètres mécaniques en répétant une sollicitation, ou de mesurer les propriétés visco-élastiques par le module complexe. Cette géométrie rend plus difficile également l'extraction d'un module non-linéaire ou la recherche d'un seuil de plasticité, car la contrainte n'est pas homogène dans cette géométrie. Enfin, on ne peut pas travailler avec des sphères sur des réseaux ayant brisé leur symétrie.

L'utilisation de colloides cylindriques règle tout ces problèmes. Les colloides s'alignent avec le champ dans leur plus grande dimension et le réseau d'actine est comprimé entre deux faces planes de deux cylindres adjacants ([Bauër, 2015]]). La surface de contact reste donc constante, quelle que soit la déformation du réseau, et la contrainte est homogène dans le réseau. On peut aussi mesurer la vitesse de polymérisation du réseau en fonction de la force opposée, ce qui permet de remonter à la force générée par le réseau d'actine. Dans le cadre de la levure, où ces réseaux sont impliqués dans la génération de force lors de l'endocytose, ce paramètre serait particulièrement intéressant à étudier.

Pour toutes ces raisons, j'ai passé un temps important à tenter d'adapter mon système biochimique au système des cylindres développé par Pierre Baüer. J'ai en particulier participé, après le départ de Pierre, à résoudre des facteurs d'irreproductibilité dans la méthode de fabrication des cylindres. J'ai également formé plusieurs stagiaires à leur fabrication. C'est la fonctionnalisation des cylindres par Las 17 qui s'est avéré le plus problématique, et à ce jour mes tentatives n'ont pas été couronnées de succès. Plusieurs protocoles de greffage de la Las17 sur la surface de cylindres superparamagnétiques ont été testés durant cette thèse, qui sont rapportées dans le paragraphe ci-dessous.

Les colloïdes superparamagnétiques non sphériques sont préparés suivant une variante du protocole de [Tavacoli et al. Soft Matter 2013], présentée et commentée en ANNEXE 8.1. La fonctionalisation de telles structure se fait lors de l'étape de sortie du moule de PDMS afin de prévenir toute intéraction entre les surfaces nues de ces colloïdes, très "collantes". Les colloïdes sont extraits dans une solution contenant la protéine choisie qui s'adsorbe à la surface. Cette étape nécessite une phase de passage aux ultrasons qui ne semble pas endommager VCA, sousunité de WASP, l'activateur mammifère de Arp2/3. La protéine portant un groupement GST ayant servi à la purifier, un pourcentage suffisant de protéines s'adsorbe par ce groupement, permettant à la partie fonctionnelle de demeurer intact et accessible à la surface des colloïdes. En revanche, dans le cas du système de la levure, l'activateur de Arp2/3 utilisé à ce jour est la protéine Las17 entière, plus grande, repliée, - et, donc - plus fragile, que VCA. Il semble que soit l'étape de passage aux ultrasons, soit l'adsorption, qui endommage la protéine et la rende non fonctionnelle. Plusieurs essais préliminaires ont été réalisés sur des variantes de cette étape de fonctionnalisation. Nous retiendrons ici l'utilisation de BSA greffée d'un groupement gluthation (GHT) pour couvrir la surface des colloïdes, à laquelle Las 17 peut venir s'accrocher dans un second temps par son groupement GST (Glutathion-S-transferase), ce qui évite de faire subir l'étape d'ultrasons à Las17. Cette méthode fonctionne et permet d'observer la croissance de gels depuis les surfaces au moins dans le cas de mélanges de protéines purifiées de levures. Cependant les gels disparaissent spontanément en quelques minutes. Nous interprétons ce phénomène comme une faiblesse de la liaison GST-GHT, qui permettrait l'échange de Las 17 avec toute autre protéine-GST du milieu entrainant donc, le relargage de l'activateur.

Nous retiendrons également des tentatives de greffage d'anticorps anti-GST à la surface des colloïdes qui n'a pas été couronnée de succès : il semble que ce type de greffage requiert une activation de la surface des colloïdes.

Nous favorisons donc une approche alternative : la découpe et l'utilisation de fragments de l'activateur Las17, à laquelle travaille nos collaborateurs de l'équipe d'A. Michelot. Trois fragments ont déjà été produits et doivent maintenant être testés. A l'instar de la VCA, nous espérons qu'ils se montrerons peu fragiles.

Un nouveau doctorant entre l'équipe du PMMH et l'équipe d'Alphée Michelot à l'IBDM, Reda Belbahri, commence cette année sa thèse sur ce sujet.

#### 7.2 Dynamique du réseau

Par ailleurs les gels très denses et très fins sur lesquels nous travaillons ne permettent pas de visualiser le détail de leur structure en microscopie classique. Or nous avons vu que la dynamique des protéines partenaires de l'actine est fondamentale dans leur influence sur la mécanique des réseaux. Une première piste pour étudier ces variations de dynamique consiste à faire des mesures de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment. Cette technique, qui consiste en l'étude de la cinétique de diffusion d'un protéine au sein d'un milieu, peut donner des informations sur les coefficients d'association et de dissociation de la protéines étudiée avec les autres molécules présentes [Bulinski et al. J. of Cell Sci. 2001]. Une étude de FRAP sur une solution de filaments d'actine réticulés par Scp1 par exemple, nous fournirait des précisions sur sa dynamique (déterminée dans cette thèse comme étant inférieure à 15 s, et supérieure 1,5 s).

Cependant ces mesures sont invasives (nécessité de détruire avec un laser une partie des protéines du réseau, avec le risque d'endommager le support d'actine et donc d'influencer sur le temps de recouvrement mesuré). Une autre stratégie consiste à faire appel à des techniques de microscopie d'imagerie en molécule unique. Ces techniques permettent de visualiser la construction de structures moléculaires, de déterminer la durée de vie d'une molécule dans un réseau ou encore de détecter des flux moléculaires. Très bien établie pour l'étude de l'actine et de ses partenaires dans le lamellipode de cellules mammifères en migration [Yamashiro et al. MBoC 2014], elle n'a pas encore été utilisée sur des réseaux branchés reconstitués in vitro sur des distances caractéristiques inférieures au demi-micromètre. Durant cette thèse j'ai consacré deux mois à tenter d'adapter la technique du Pr. Watanabe (Kyoto University) à mes gels d'extraits cellulaires de levure grâce à un financement de la JSPS, Summer Program. Le but était d'observer et de mesurer la ou les dynamiques d'intéraction de protéines de réticulation et d'Arp2/3dans mes gels. Différents problèmes expérimentaux, allant des facteurs d'irreproductibilité sur la fabrication des colloïdes plats que j'essayais d'utiliser et les difficultés de greffage de la Las17 à leur surface à des problèmes d'autofluorescence des colloïdes ne m'ont pas permis de réaliser ces mesures, mais des pistes restent ouvertes. Par exemple, réaliser le greffage de la Las17 directement sur la surface de verre de la chambre d'observation par des techniques de micropatterning permettrait de s'affranchir de nombreux freins à la réalisation de cette expérience.



FIGURE 7.1 – Schéma du montage avec des colloïdes "plat" pour imagerie. A. schéma d'une chambre préparée à partir de 2 lamelles très fines. Dans l'encart : le type de réseau que l'on obtient à ce stade, dans le meilleur de cas, autour des colloïdes : une couverture très fine de gel d'actine qui ne s'éloigne pas de la surface ; B. Photographie d'un cube fonctionnalisé sur lequel "croît" un réseau de type sauvage (WT). La souche de levure est mutée pour exprimer le fluorophore GFP. L'expérience est réalisée par un mélange de extrait non fluorescent et d'extrait fluorescent pour diminuer la concentration en fluorophore. Sur cette image, 2% d'extrait fluorescent est trop élevée pour observer des molécules uniques.

## Bibliographie

- Achard, V., J. L. Martiel, A. Michelot, C. Guérin, A. C. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski (2010). A "Primer"-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility. *Current Biology* 20(5), 423–428.
- Aghamohammadzadeh, S. and K. R. Ayscough (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nature cell biology* 11(8), 1039–42.
- Akin, O. and R. D. Mullins (2008). Capping Protein Increases the Rate of Actin-Based Motility by Promoting Filament Nucleation by the Arp2/3 Complex. Cell 133(5), 841–851.
- Amann, K. J. and T. D. Pollard (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nature cell biology* 3(3), 306–310.
- Amberg, D. C. (1998). Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Molecular biology of the cell* 9(12), 3259–62.
- Asakura, T., T. Sasaki, F. Nagano, a. Satoh, H. Obaishi, H. Nishioka, H. Imamura, K. Hotta, K. Tanaka, H. Nakanishi, and Y. Takai (1998). Isolation and characterization of a novel actin filament-binding protein from Saccharomyces cerevisiae. *Oncogene* 16, 121–130.
- Basu, R., E. L. Munteanu, and F. Chang (2014). Role of turgor pressure in endocytosis in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* 25(5), 679–687.
- Bathe, M., C. Heussinger, M. Claessens, A. R. Bausch, and E. Frey (2006). Cytoskeletal bundle bending, buckling, and stretching behavior.
- Bathe, M., C. Heussinger, M. M. a. E. Claessens, A. R. Bausch, and E. Frey (2008). Cytoskeletal bundle mechanics. *Biophysical journal* 94(8), 2955–2964.
- Bauër, P. (2015). Mesures mecaniques et génération de forces de réseaux d'actine branchés avec des micro-cylindres magnétiques. Ph. D. thesis, ESPCI / Pierre et Marie Curie.
- Bausch, A. R. and K. Kroy (2006, apr). A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics* 2(4), 231–238.
- Bergert, M., A. Erzberger, R. A. Desai, I. M. Aspalter, A. C. Oates, G. Charras, G. Salbreux, and E. K. Paluch (2015, apr). Force transmission during adhesion-independent migration. *Nat Cell Biol* 17(4), 524–529.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R. M. Golsteyn, M.-F. Carlier, and C. Sykes (2002). The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417(6886), 308–311.
- Berro, J. and T. D. Pollard (2014). Local and global analysis of endocytic patch dynamics in fission yeast using a new "temporal superresolution" realignment method. *Molecular biology* of the cell 25(22), 3501–14.

- Bieling, P., T. D. Li, J. Weichsel, R. McGorty, P. Jreij, B. Huang, D. A. Fletcher, and R. D. Mullins (2016). Force Feedback Controls Motor Activity and Mechanical Properties of Self-Assembling Branched Actin Networks. *Cell* 164(1-2), 115–127.
- Blanchoin, L., K. J. Amann, H. Higgs, J.-B. Marchand, D. A. Kaiser, and T. D. Pollard (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404(1994), 1007–1011.
- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and P. Julie (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews* 94, 235–263.
- Borisy, G. G. and T. M. Svitkina (2000). Actin machinery : Pushing the envelope. *Current Opinion in Cell Biology* 12(1), 104–112.
- Broedersz, C. P., M. Depken, N. Y. Yao, M. R. Pollak, D. A. Weitz, and F. C. MacKintosh (2010). Cross-link-governed dynamics of biopolymer networks. *Physical Review Letters* 105(23), 1–4.
- Bulinski, J. C., D. J. Odde, B. J. Howell, T. D. Salmon, and C. M. Waterman-Storer (2001). Rapid dynamics of the microtubule binding of ensconsin in vivo. *Journal of cell science 114* (Pt 21), 3885–3897.
- Burston, H. E., L. Maldonado-Báez, M. Davey, B. Montpetit, C. Schluter, B. Wendland, and E. Conibear (2009, jun). Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *Journal of Cell Biology* 185(6), 1097–1110.
- Bustamante, C., J. Marko, E. Siggia, and S. Smith (1994). Entropic elasticity of lambda-phage DNA. Science 265(5178).
- Cameron, L. A., M. J. Footer, A. van Oudenaarden, and J. A. Theriot (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proceedings of the National* Academy of Sciences USA 96(9), 4908–13.
- Carlier, M.-F. (2010). Actin-based Motility.
- Carlier, M. F., D. Pantaloni, and E. D. Korn (1984). Evidence for an ATP cap at the ends of actin filaments and its regulation of the F-actin steady state. *Journal of Biological Chemis*try 259(16), 9983–9986.
- Carlsson, A. (2003). Growth Velocities of Branched Actin Networks. *Biophysical Journal* 84(5), 2907–2918.
- Chadwick, R. S. (2002, jan). Axisymmetric Indentation of a Thin Incompressible Elastic Layer. SIAM Journal on Applied Mathematics 62(5), 1520–1530.
- Charras, G. and E. Paluch (2008). Blebs lead the way : how to migrate without lamellipodia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 9.*
- Charras, G. T. and M. a. Horton (2002). Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophysical journal* 82(6), 2970–2981.
- Charras, G. T., C. K. Hu, M. Coughlin, and T. J. Mitchison (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. J. Cell Biol. 175, 477–490.
- Charras, G. T., T. J. Mitchison, and L. Mahadevan (2009). Animal cell hydraulics. Journal of cell science 122 (Pt 18), 3233–41.
- Chaudhuri, O., S. H. Parekh, and D. A. Fletcher (2007). Reversible stress softening of actin networks. *Nature* 445(7125), 295–298.

- Chen, Q., N. Courtemanche, and T. D. Pollard (2015). Aip1 promotes actin filament severing by cofilin and regulates constriction of the cytokinetic contractile ring. *Journal of Biological Chemistry 290*(4), 2289–2300.
- Choquet, D., D. P. Felsenfeld, and M. P. Sheetz (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88(1), 39–48.
- Claessens, M. M. a. E., M. Bathe, E. Frey, and A. R. Bausch (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. *Nature materials* 5(9), 748–753.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). Regulated portals of enry into the cell. Nature 422(March), 37–43.
- Costanzo, M., A. Baryshnikova, J. Bellay, Y. Kim, E. D. Spear, C. S. Sevier, H. Ding, J. L. Y. Koh, K. Toufighi, S. Mostafavi, J. Prinz, R. P. St Onge, B. VanderSluis, T. Makhnevych, F. J. Vizeacoumar, S. Alizadeh, S. Bahr, R. L. Brost, Y. Chen, M. Cokol, R. Deshpande, Z. Li, Z.-Y. Lin, W. Liang, M. Marback, J. Paw, B.-J. San Luis, E. Shuteriqi, A. H. Y. Tong, N. van Dyk, I. M. Wallace, J. A. Whitney, M. T. Weirauch, G. Zhong, H. Zhu, W. A. Houry, M. Brudno, S. Ragibizadeh, B. Papp, C. Pál, F. P. Roth, G. Giaever, C. Nislow, O. G. Troyanskaya, H. Bussey, G. D. Bader, A.-C. Gingras, Q. D. Morris, P. M. Kim, C. A. Kaiser, C. L. Myers, B. J. Andrews, C. Boone, S. J. Dixon, M. Costanzo, A. Baryshnikova, B. Andrews, C. Boone, L. Hartwell, A. H. Tong, A. H. Tong, R. Mani, R. P. S. Onge, J. L. Hartman, G. Giaever, F. P. Roth, R. P. S. Onge, D. Segrè, A. Deluna, G. M. Church, R. Kishony, A. Huber, E. J. Chen, C. A. Kaiser, M. C. Jonikas, M. B. Metzger, S. Michaelis, S. Leidel, P. B. Rahl, C. Z. Chen, R. N. Collins, A. Esberg, B. Huang, M. J. Johansson, A. S. Byström, T. Naumanen, L. D. Johansen, E. T. Coffey, T. Kallunki, L. D. Johansen, S. F. Levy, M. L. Siegal, A. Levchenko, P. M. Kim, L. J. Lu, Y. Xia, M. B. Gerstein, H. B. Fraser, D. P. Wall, A. E. Hirsh, C. Pál, B. Papp, L. D. Hurst, P. M. Kim, A. Sboner, Y. Xia, M. Gerstein, B. Lehner, C. Crombie, J. Tischler, A. Fortunato, A. G. Fraser, M. E. Hillenmeyer, M. J. Dunham, A. C. Gavin, N. J. Krogan, H. Yu, K. Tarassov, J. A. de Visser, C. D. Meiklejohn, D. L. Hartl, A. B. Parsons, and C. S. Sevier (2010). The genetic landscape of a cell. Science (New York, N.Y.) 327(5964), 425 - 31.
- Costanzo, M., B. VanderSluis, E. N. Koch, A. Baryshnikova, C. Pons, G. Tan, W. Wang, M. Usaj, J. Hanchard, S. D. Lee, V. Pelechano, E. B. Styles, M. Billmann, J. van Leeuwen, N. van Dyk, Z.-Y. Lin, E. Kuzmin, J. Nelson, J. S. Piotrowski, T. Srikumar, S. Bahr, Y. Chen, R. Deshpande, C. F. Kurat, S. C. Li, Z. Li, M. M. Usaj, H. Okada, N. Pascoe, B.-J. San Luis, S. Sharifpoor, E. Shuteriqi, S. W. Simpkins, J. Snider, H. G. Suresh, Y. Tan, H. Zhu, N. Malod-Dognin, V. Janjic, N. Przulj, O. G. Troyanskaya, I. Stagljar, T. Xia, Y. Ohya, A.-C. Gingras, B. Raught, M. Boutros, L. M. Steinmetz, C. L. Moore, A. P. Rosebrock, A. A. Caudy, C. L. Myers, B. Andrews, and C. Boone (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science* 353(6306), aaf1420–aaf1420.

D'Elia, G. and F. Holsten (1998). Kognitiv terapi har visat god effekt pa panikangest.

- Derivery, E. and A. Gautreau (2010). Generation of branched actin networks : Assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* 32(2), 119–131.
- Dimitriadis, E. K., F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, and R. S. Chadwick (2002). Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophysical Journal* 82(5), 2798–2810.
- Dmitrieff, S. and F. Nédélec (2016). Amplification of actin polymerization forces. Journal of Cell Biology 212(7), 763–766.

- du Roure, O., A. Saez, A. Buguin, R. H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America 102(7), 2390–2395.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126(4), 677–689.
- Engqvist-Goldstein, Å. E. and D. G. Drubin (2003, nov). Actin Assembly and Endocytosis : From Yeast to Mammals. Annual Review of Cell and Developmental Biology 19(1), 287–332.
- Feliciano, D. and S. M. Di Pietro (2012). SLAC, a complex between Sla1 and Las17, regulates actin polymerization during clathrin-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell 23*, 4256–4272.
- Florens, L., M. P. Washburn, J. D. Raine, R. M. Anthony, M. Grainger, J. D. Haynes, J. K. Moch, N. Muster, J. B. Sacci, D. L. Tabb, A. A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M. J. Gardner, A. A. Holder, R. E. Sinden, J. R. Yates, and D. J. Carucci (2002). A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. *Nature* 419(6906), 520–6.
- Fonnum, G., C. Johansson, A. Molteberg, S. Mørup, and E. Aksnes (2005). Characterisation of Dynabeads® by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1), 41–47.
- Gardel, M. L., F. Nakamura, J. H. Hartwig, J. C. Crocker, T. P. Stossel, and D. a. Weitz (2006). Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103*(6), 1762–1767.
- Gardel, M. L., J. H. Shin, F. C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira, and D. A. Weitz (2004a). Elastic Behavior of Cross-Linked and Bundled Actin Networks. *Science* 304(5675), 1301–1305.
- Gardel, M. L., J. H. Shin, F. C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. A. Matsudaira, and D. A. Weitz (2004b). Scaling of F-actin network rheology to probe single filament elasticity and dynamics. *Physical Review Letters* 93(18), 1–4.
- Gardel, M. L., M. T. Valentine, J. C. Crocker, A. R. Bausch, and D. A. Weitz (2003). Microrheology of Entangled F-Actin Solutions. *Physical Review Letters* 91(15), 158302.
- Geli, M. I., A. Wesp, and H. Riezman (1998). Distinct functions of calmodulin are required for the uptake step of receptor-mediated endocytosis in yeast : The type I myosin Myo5p is one of the calmodulin targets. *EMBO Journal* 17(3), 635–647.
- Gheorghe, D. M., S. Aghamohammadzadeh, I. I. Smaczynska-de Rooij, E. G. Allwood, S. J. Winder, and K. R. Ayscough (2008). Interactions between the yeast SM22 homologue Scp1 and actin demonstrate the importance of actin bundling in endocytosis. *Journal of Biological Chemistry 283*(22), 15037–15046.
- Goode, B. L., J. A. Eskin, and B. Wendland (2015). Actin and endocytosis in budding yeast. Genetics 199(2), 315–58.
- Goode, B. L., A. a. Rodal, G. Barnes, and D. G. Drubin (2001). Activation of the Arp2 / 3 Complex by the Actin Filament Binding Protein Abp1p. *Journal of Cell Biology* 153(3), 627–634.

- Goodman, A., B. L. Goode, P. Matsudaira, and G. R. Fink (2003). The Saccaromyces cerevisiae Calponin/Transgelin Homolog Scp1 Functions with Fimbrin to Regulate Stability and Organization of the Actin Cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell* 14 (July), 2617–2629.
- Gressin, L., A. Guillotin, C. Guérin, L. Blanchoin, and A. Michelot (2015). Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly. *Current Biology* 25(11), 1437–1447.
- Harada, T., J. Swift, J. Irianto, J. W. Shin, K. R. Spinler, A. Athirasala, R. Diegmiller, P. C. D. P. Dingal, I. L. Ivanovska, and D. E. Discher (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *Journal of Cell Biology* 204(5), 669–682.
- Hertz, H. (1881). Ueber die Berührung fester elastischer Körper. Journal für die reine und angewandte Mathematik 92, 156–171.
- Heussinger, C., M. Bathe, and E. Frey (2007). Statistical mechanics of semiflexible bundles of wormlike polymer chains. *Physical Review Letters* 99(4), 1–4.
- Hinner, B., M. Tempel, E. Sackmann, K. Kroy, and E. Frey (1998). Entanglement, Elasticity, and Viscous Relaxation of Actin Solutions. *Physical Review Letters* 81(12), 2614–2617.
- Isambert, H., P. Venier, A. C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M.-F. Carlier (1995). Flexibility of Actin Filaments Derived from Thermal Fluctuations. *The Journal of Biological Chemistry* 270(19), 11437–11444.
- Janmey, P. A. and C. A. McCulloch (2007). Cell Mechanics : Integrating Cell Responses to Mechanical Stimuli. Annual Review of Biomedical Engineering 9(1), 1–34.
- Jensen, M. H., J. Watt, J. Hodgkinson, C. Gallant, M. El-mezgueldi, T. E. Angelini, K. G. Morgan, and J. R. Moore (2012). Effects of basic calponin on the flexural mechanics and stability of F-actin. *Cytoskeleton* 69(1), 49–58.
- Johnson, K. L. (1985). Contact Mechanics.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes (1990). Atomic structure of the actin : DNase I complex.
- Kaksonen, M., C. P. Toret, and D. G. Drubin (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* 123(2), 305–320.
- Kang, H., M. J. Bradley, W. Cao, K. Zhou, E. E. Grintsevich, A. Michelot, C. V. Sindelar, M. Hochstrasser, and E. M. De La Cruz (2014, dec). Site-specific cation release drives actin filament severing by vertebrate cofilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(50), 17821–6.
- Kang, H., M. J. Bradley, B. R. McCullough, A. Pierre, E. E. Grintsevich, E. Reisler, and E. M. De La Cruz (2012). Identification of cation-binding sites on actin that drive polymerization and modulate bending stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(42), 16923–16927.
- Kim, K., A. Yamashita, M. A. Wear, Y. Maéda, and J. A. Cooper (2004). Capping protein binding to actin in yeast : Biochemical mechanism and physiological relevance. *Journal of Cell Biology* 164(4), 567–580.
- Kiuchi, T., M. Higuchi, A. Takamura, M. Maruoka, and N. Watanabe (2015). Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes. *Nature me*thods 12(8), 743–746.
- Koenderink, G. H., Z. Dogic, F. Nakamura, P. M. Bendix, F. C. MacKintosh, J. H. Hartwig, T. P. Stossel, and D. a. Weitz (2009). An active biopolymer network controlled by molecular motors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(36), 15192–15197.
- Kovar, D. R. and T. D. Pollard (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(41), 14725–14730.
- Kumar, S. and V. M. Weaver (2009). Mechanics, malignancy, and metastasis : The force journey of a tumor cell. *Cancer and Metastasis Reviews* 28(1-2), 113–127.
- Lieleg, O., M. M. a. E. Claessens, and A. R. Bausch (2010). Structure and dynamics of crosslinked actin networks. Soft Matter 6(2), 218.
- Lieleg, O., M. M. A. E. Claessens, C. Heussinger, E. Frey, and A. R. Bausch (2007). Mechanics of bundled semiflexible polymer networks. *Physical Review Letters* 99(8), 3–6.
- Lieleg, O., M. M. A. E. Claessens, Y. Luan, and A. R. Bausch (2008). Transient binding and dissipation in cross-linked actin networks. *Physical Review Letters* 101(10), 1–4.
- Lieleg, O., J. Kayser, G. Brambilla, L. Cipelletti, and A. R. Bausch (2011). Slow dynamics and internal stress relaxation in bundled cytoskeletal networks. *Nature materials* 10(3), 236–242.
- Lin, D. C., D. I. Shreiber, E. K. Dimitriadis, and F. Horkay (2009). Spherical indentation of soft matter beyond the Hertzian regime : numerical and experimental validation of hyperelastic models David. *Biomech Model Mechanobiol* 8(5), 345–358.
- Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal* 79(1), 144–152.
- Loisel, T. P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M. F. Carlier (1999). Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins. *Nature* 401 (6753), 613–616.
- Lopez-Serra, P., M. Marcilla, A. Villanueva, A. Ramos-Fernandez, A. Palau, L. Leal, J. E. Wahi, F. Setien-Baranda, K. Szczesna, C. Moutinho, A. Martinez-Cardus, H. Heyn, J. Sandoval, S. Puertas, A. Vidal, X. Sanjuan, E. Martinez-Balibrea, F. Viñals, J. C. Perales, J. B. Bramsem, T. F. Ørntoft, C. L. Andersen, J. Tabernero, U. McDermott, M. B. Boxer, M. G. Vander Heiden, J. P. Albar, and M. Esteller (2014). A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nature communications 5*, 3608.
- Marcy, Y., J. Prost, M.-F. Carlier, and C. Sykes (2004). Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(16), 5992–7.
- McCullough, B. R., E. E. Grintsevich, C. K. Chen, H. Kang, A. L. Hutchison, A. Henn, W. Cao, C. Suarez, J. L. Martiel, L. Blanchoin, E. Reisler, and E. M. De La Cruz (2011). Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophysical Journal* 101(1), 151–159.
- Michelot, A., M. Costanzo, A. Sarkeshik, C. Boone, J. R. Yates, and D. G. Drubin (2010). Reconstitution and protein composition analysis of endocytic actin patches. *Current Bio-logy* 20(21), 1890–1899.
- Michelot, A. and D. G. Drubin (2014). Chapter Twenty-One Dissecting Principles Governing Actin Assembly Using Yeast Extracts. In *Methods in Enzymology*, Volume 540, pp. 381–397.

- Michelot, A., A. Grassart, V. Okreglak, M. Costanzo, C. Boone, and D. G. Drubin (2013). Actin Filament Elongation in Arp2/3-Derived Networks Is Controlled by Three Distinct Mechanisms. *Developmental Cell* 24(2), 182–195.
- Minc, N., A. Boudaoud, and F. Chang (2009). Mechanical Forces of Fission Yeast Growth. *Current Biology* 19(13), 1096–1101.
- Mochida, J., T. Yamamoto, K. Fujimura-Kamada, and K. Tanaka (2002). The novel adaptor protein, Mti1p, and Vrp1p, a homolog of Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP), may antagonistically regulate type I myosins in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 160(3), 923–934.
- Moeendarbary, E., L. Valon, M. Fritzsche, A. R. Harris, D. a. Moulding, A. J. Thrasher, E. Stride, L. Mahadevan, and G. T. Charras (2013). The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nature materials* 12(3), 253–61.
- Mogilner, A. and G. Oster (2003). Force Generation by Actin Polymerization II : The Elastic Ratchet and Tethered Filaments. *Biophysical Journal* 84(3), 1591–1605.
- Moseley, J. B. and B. L. Goode (2006). The yeast actin cytoskeleton : from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 70*(3), 605–645.
- Nadkarni, A. V. and W. M. Brieher (2014). Aip1 destabilizes cofilin-saturated actin filaments by severing and accelerating monomer dissociation from ends. *Current Biology* 24(23), 2749– 2757.
- Noireaux, V., R. M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes (2000). Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophysical journal* 78(3), 1643–54.
- Pantaloni, D. and M. F. Carlier (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin Beta4. Cell 75(5), 1007–1014.
- Parekh, S. H., O. Chaudhuri, J. a. Theriot, and D. a. Fletcher (2005). Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nature cell biology* 7(12), 1219–1223.
- Pollard, T. D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *The Journal of Cell Biology* 103(6).
- Preciado López, M., F. Huber, I. Grigoriev, M. O. Steinmetz, A. Akhmanova, G. H. Koenderink, and M. Dogterom (2014). Actin-microtubule coordination at growing microtubule ends. *Nature communications* 5, 4778.
- Pujol, T. (2012). Etude Mécanique des gels d'actine branchés. Ph. D. thesis, ESPCI / Paris Diderot.
- Pujol, T., O. du Roure, M. Fermigier, and J. Heuvingh (2012). Impact of branching on the elasticity of actin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(26), 10364– 10369.
- Ramms, L., G. Fabris, R. Windoffer, N. Schwarz, R. Springer, C. Zhou, J. Lazar, S. Stiefel, N. Hersch, U. Schnakenberg, T. M. Magin, R. E. Leube, R. Merkel, and B. Hoffmann (2013). Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proceedings of* the National Academy of Sciences of the United States of America 110(46), 18513–8.
- Ridley, A. J. (2003). Cell Migration : Integrating Signals from Front to Back. Science 302(5651), 1704–1709.

- Robinson, R. C., K. Turbedsky, D. A. Kaiser, J.-b. Marchand, H. N. Higgs, S. Choe, and T. D. Pollard (2001). Crystal Structure of Arp2 / 3 Complex. Science 294 (November), 1679–1685.
- Schaber, J., M. A. Adrover, E. Eriksson, S. Pelet, E. Petelenz-Kurdziel, D. Klein, F. Posas, M. Goksör, M. Peter, S. Hohmann, and E. Klipp (2010). Biophysical properties of Saccharomyces cerevisiae and their relationship with HOG pathway activation. *European Biophysics Journal 39*(11), 1547–1556.
- Sirotkin, V., J. Berro, K. Macmillan, L. Zhao, and T. D. Pollard (2010). Quantitative Analysis of the Mechanism of Endocytic Actin Patch Assembly and Disassembly in Fission Yeast. *Molecular biology of the cell 21*(24), 2894–2904.
- Skau, C. T. and D. R. Kovar (2010). Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Current Biology* 20(16), 1415–1422.
- Smythe, E. and K. R. Ayscough (2006). Actin regulation in endocytosis. Journal of cell science 119(Pt 22), 4589–4598.
- Storm, C., J. J. Pastore, F. MacKintosh, T. Lubensky, and P. A. Jamney (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435 (May), 191–194.
- Stricker, J., T. Falzone, and M. Gardel (2010). Mechanics of the F-actin Cytoskeleton Jonathan. Journal of Biomechanics 100(2), 130–134.
- Sun, Y., A. C. Martin, and D. G. Drubin (2006). Endocytic Internalization in Budding Yeast Requires Coordinated Actin Nucleation and Myosin Motor Activity. *Developmental Cell* 11(1), 33–46.
- Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. Acta Biomater 3(4), 413–438.
- Taunton, J., B. A. Rowning, M. L. Coughlin, M. Wu, R. T. Moon, T. J. Mitchison, and C. A. Larabell (2000). Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *Journal of Cell Biology* 148(3), 519–530.
- Tavacoli, J. W., P. Bauër, M. Fermigier, D. Bartolo, J. Heuvingh, and O. du Roure (2013). The fabrication and directed self-assembly of micron-sized superparamagnetic non-spherical particles. Soft Matter 9(38), 9103.
- Tharmann, R., M. M. A. E. Claessens, and A. R. Bausch (2007). Viscoelasticity of isotropically cross-linked actin networks. *Physical Review Letters* 98(8), 8–11.
- Toret, C. P. and D. G. Drubin (2006). The budding yeast endocytic pathway. *Journal of cell science* 119(Pt 22), 4585–7.
- Trichet, L., J. Le Digabel, R. J. Hawkins, S. R. K. Vedula, M. Gupta, C. Ribrault, P. Hersen, R. Voituriez, and B. Ladoux (2012). Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of* the United States of America 109(18), 6933–8.
- Tritarelli, A., E. Oricchio, M. Ciciarello, R. Mangiacasale, A. Palena, P. Lavia, S. Soddu, and E. Cundari (2004a). p53 Localization at Centrosomes during Mitosis and Postmitotic Checkpoint Are ATM-dependent and Require Serine 15 Phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 15(April), 3751–3737.
- Tritarelli, A., E. Oricchio, M. Ciciarello, R. Mangiacasale, A. Palena, P. Lavia, S. Soddu, and E. Cundari (2004b). p53 Localization at Centrosomes during Mitosis and Postmitotic Checkpoint Are ATM-dependent and Require Serine 15 Phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 15(April), 3751–3737.

- van der Gucht, J., E. Paluch, J. Plastino, and C. Sykes (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(22), 7847–7852.
- Vignjevic, D., J. Peloquin, and G. G. Borisy (2006). In Vitro Assembly of Filopodia-Like Bundles. Methods in Enzymology 406, 727–739.
- Wachsstock, D. H., W. H. Schwartz, and T. D. Pollard (1993). Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophysical journal* 65(1), 205–14.
- Weinberg, J. and D. G. Drubin (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. Trends Cell Biol. 100(2), 130–134.
- Welch, M. D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D. A. Portnoy, and T. J. Mitchison (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the Listeria monocytogenes ActA protein in actin filament nucleation. Science (New York, N.Y.) 281(1981), 105–108.
- Xu, J., V. Viasnoff, and D. Wirtz (1998). Compliance of actin filament networks measured by particle-tracking microrheology and diffusing wave spectroscopy. *Rheologica Acta 37*(4), 387–398.
- Yamashiro, S., H. Mizuno, M. B. Smith, G. L. Ryan, T. Kiuchi, D. Vavylonis, and N. Watanabe (2014). New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. *Molecular Biology of the Cell* 25(7), 1010–1024.
- Yennek, S., M. Burute, M. Théry, and S. Tajbakhsh (2014). Cell adhesion geometry regulates non-random DNA segregation and asymmetric cell fates in mouse skeletal muscle stem cells. *Cell Reports* 7(4), 961–970.
- Zhang, H., F. Landmann, H. Zahreddine, D. Rodriguez, M. Koch, and M. Labouesse (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature* 471 (7336), 99–103.
- Zhang, H. and M. Widom (1995). Field-induced forces in colloidal particle chains. *Physical Review E* 51(3), 2099–2103.

## Chapitre 8

## Annexes

### 8.1 Microfabrication de colloïdes plats

La microfabrication de colloïdes de forme contrôlée se déroule en quatre étapes : tout d'abord une image des futurs colloïdes sous forme de plots en résine est réalisée par photolitographie. C'est la préparation d'un "wafer". Ensuite un moule en polydiméthylsiloxane (PDMS) est réalisé à partir du wafer. Puis ce moule est rempli avec la solution de base des colloïdes et mise à réticuler. Finalement ces colloïdes sont extraits et fonctionnalisés pour les expériences. Le protocle cidessous est basé sur celui établi par Joseph Tavacoli et Pierre Bauër ([Tavacoli et al. 2013]), auquel a été apporté une modification pour la troisième étape : la préparation de la solution de nanobilles d'oxydes de fer et de matrice polymère à réticuler.

### 8.1.1 Fabrication d'un wafer : photolitographie

Tout d'abord nous fabriquons un wafer de silicium portant les motifs désirés par photolitographie (voir figure 8.1 A.). Ce wafer est le négatif des moules en PDMS qui servirons à préparer les colloïdes.

Un masque de chrome avec les motifs (société *Selba* à partir d'un patron réalisé avec le logiciel AutoCAD) permet de créer des structures avec une résolution jusqu'à 2  $\mu$ m (figure 8.1 B.).

La SU-8 est une résine photosensible négative couramment utilisée dans la microfabrication. Son pic d'absorption maximale se situe à 365 nm. Lorqu'elle est exposée, les chaînes de la résine réticulent ([*Photolithography,Theory and Application of Photoresists, Etchants and Solvents*, MicroChemicals, 2012]). Etalée sur un wafer de silicium avec l'épaissuer choisie (contrôlée par un étalage au spin-coater), la résine est irradiée au travers du masque. Le wafer est ensuite "révélé", c'est à dire lavé avec un solvant de la SU-8 non réticulée. Un wafer peut servir de nombreuses fois à préparer des moules PDMS, qui, s'ils sont moins fragile et beaucoup moins chers que les wafers, ne durent pas.

### 8.1.2 Réalisation d'un moule en PDMS

Du PDMS (10% en agent réticulant Sylgard) est versé sur le wafer et mis à réticuler à la chaleur. Après démoulage, il est silanisé (activation de la surface dans un four à plasma puis incubation dans un atmosphère saturée en trichlorosilane) afin de rendre la surface hydrophobe et surtout inactive. Le but est d'empêcher le moule de PDMS de réagir par la suite en surface avec un autre composé (PDMS ou matrice des colloïdes à fabriquer). Le moule en PDMS est donc soumis à un traitement par plasma à oxygène puissant, composé d'une étape de remplacement du gaz de la chambre par de l'O2 (30 s à 100 mTor ventilé en O2) suivit de 1 minute à 100 mTor avec génération d'un plasma à 30W. Ce traitement doit activer le plus de sites possible à la surface, mais sans l'endommager. Immédiatement après le plasma, le moule est transféré dans un



FIGURE 8.1 – A. Etapes de fabrication du wafer; B.Exemple de masque utilisé pour la photolitographie. Schémas tiré de la thèse de P. Bauër (2015).

milieu anhydre à l'atmosphère saturée en 1H, 1H, 2H, 2H, -perfluorooctyltrichlorosilane et incubé pendant 1h à 1h30min. Ce composé est toxique, aussi travaille-t-on sous hotte. Pour pouvoir remplir le moule avec notre solution de base pour colloïdes, il faut que la surface du PDMS soit hydrophobe et lisse (les conditions de mouillage sont déterminantes). Or la silanisation laisse des dépôts épais (plusieurs couches) par endroits. Le moule est donc nettoyé par dépôt et réticulation d'une couche de PDMS. Toutes le molécules de silane non réticulées avec la surface du moule sont prise dans le nouveaux PDMS. La couche de PDMS de nettoyage est enlevée juste avant le remplissage afin de conserver une surface la plus propre possible.

### 8.1.3 Fabrication des colloïdes : nouvel agent réticulant

La solution de base avec laquelle nous remplissons les puits est composée d'ethoxylated trimethylolpropanetriacrylate (ETPTA) et de particules superparamagnétiques recouvertes de silice de 300 nm de diamètre (Adem-beads). Cette combinaison a été choisie car les indices de réfraction de l'ETPTA et des billes sont proches. Cela confère une bonne stabilité à la suspension en réduisant les interactions de Van der Waals. En effet les forces de Van der Waals favorisent la floculation ([Jiang et McFarland, 2004]), or nous voulons manipuler une suspension homogène et stable.

Dans le protocole original, un volume utile de la solution d'ETPTA et de billes était préparé, avec 10% en masse d'un photointiateur sensible aux UV. Une fois le remplissage des moules effectué, cet agent de réticulation nécessitait l'utilisation d'une lampe UV à 254 nm pendant de nombreuses heures car les billes superparamagnétiques rendent la solution très opaque. Ce mode de réticulation n'était que peu reproductible (selon l'emplacement relatif de la lampe et de l'échantillon, les résultats obtenus pouvaient varier fortement, des cylindres en très bon état, à des morceaux brisés). Nous préparons donc désormais la solution avec un thermoinitiateur, AIBN, et la réticulation a lieu dans un four à 130°.

3,5% en masse d'AIBN sont mélangés à l'ETPTA dans un bain à ultrason chauffé à 40° car l'AIBN est peu miscible dans l'ETPTA a température ambiante. Les billes sont ensuite ajoutées, et mélangées par sonication également. Une goutte de solution est prélevée régulièrement pour vérifier au microscope l'homogénéité de la suspension. Lorsqu'elle est jugée satisfaisante, un morceau du moule total, portant des puits peut être remplis en faisant rouler lentement une goutte de la suspensions sur la surface du PDMS. Après deux passages, le reste de la goutte est récupérée et le moule est mis sous cloche à vide pendant une demi-heure. Cette étape de dégazage permet à la solution déposée dans la partie haute des puits de descendre au fond. L'ensemble de l'opération est ensuite renouvelée une fois, puis le moules est mis à réticuler au four pour 2 heures à une nuit, selon l'organisation de l'expérimentateur.



FIGURE 8.2 – Schéma de la composition d'une bille superparamagnétique de 300 nm de diamètre et formule chimique développée de l'ETPTA.

### 8.1.4 Extraction des colloïdes

Pour sortir les colloïdes de leur gaine de PDMS, deux solution existent : polymériser une fine couche de polymère sur le moule et en retirant ce film, les colloïdes sont extraits des puits. Le polymère utilisé pour ce processus doit être soluble afin de pouvoir ensuite libérer les colloïdes en solution. Le problème de cette technique est que nous n'avons pas trouvé un polymère d'extraction et son solvant qui soient biocompatibles. De plus, au moment où les colloïdes sont démoulés, leurs surface sont très réactives et c'est à ce moment là qu'il faut greffer l'activateur. Nous extrayons donc les colloïdes directement dans la solution d'activateur de Arp2/3. Cette extraction se fait grâce aux ultrasons qui viennent déloger les colloïdes de leurs puits. A cette sollicitation nous ajoutons une déformation du moule (l'image des "moules à muffin en silicone" décrit assez bien la déformation appliquée) pour faciliter la sortie des colloïdes. Le problème de cette étape est bien sûr le passage obligé des protéines qui sont dans la solution de fonctionalisation par le bain de soonication, pendant au moins 10 minutes. Si la protéine est fragile, comme c'est le cas pour Las17, cette étape se révèle critique.

# 8.2 Comparaison des critères de sélection du fit sur rampe de compression

Nous avons présenté au chapitre 3 les critères de sélection des fit valides sur nos courbes de rampe de force en justifiant un changement par rapport au modèle choisi dans l'expérience originale par la découverte d'un biais pour les réseaux très mous. Dans cette annexe nous présentons la comparaison des critères qui a amené à cette conclusion.

#### 8.2.1 Anciens critères : def1 et def2

Tout d'abord, si les gels sont très mous, on risque de se trouver dans le cas où l'indentation  $\delta$  est du même ordre de grandeur voire plus importante que le rayon de contact a entre les deux sphères. Cela peut générer une erreur sur l'estimation de l'aire de contact (calculée pour un matériau suivant la loi de Hooke) et donc sur la valeur du module élastique mesuré. Lin et al. 2009 avait montré que pour un rapport indentation sur rayon équivalent de l'objet (une bille et une bille couverte d'un gel ramenés à une bille et un plan) inférieur à 0,4,  $\frac{\delta}{R_{eq}} < 0,4$ , (où  $R_{eq} = \frac{1}{\frac{1}{R_{bille} + \frac{1}{R_{bille} + h_{gel}}}$ ), la surface de contact telle que calculée par le modèle de Hertz reste valide . Cette condition était utilisée expérimentalement comme moyen d'exclusion de points de mesure, sous la forme

$$\frac{4}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\delta}{R_{eq}}} < 0,5 \tag{8.1}$$

De même, si l'indentation est grande par rapport à l'épaisseur du gel testé, la bille dure (de module d'Young de l'ordre du GPa, pour des gels de modules allant de 1 à 7kPa) devient sensible et fausse totalement les mesures. Un second critère de validation expérimentale sur le rapport indentation sur épaisseur du gel (notée  $h_{gel}$ ) a été mis en place pour l'expérience originale :

$$\frac{\delta}{h_{gel}} < 0,5 \tag{8.2}$$

Or, le système d'extraits cellulaires de levure comme les gels reconstitués à partir de protéines purifiées de levure se trouvent être particulièrement sensibles au choix des critères de validité car de très faible épaisseur (de l'ordre de 100 à 300nm) et très mou (module d'Young inférieur à 1kPa) respectivement. Beaucoup de courbes sont ainsi éliminée par les deux critères 8.1 et 8.2. Par la suite je parlerai de l'unique critère de validité "vd" pour me référer au cas de figure où les deux conditions sont remplies.

### 8.2.2 Effet sur les distributions des mesures

Pour certaines conditions l'impact du changement de paramètre de validation des mesures est très flagrant sur le nombre de points de mesure et/ou l'allure des distributions. Les mesures les plus affectées par ces changements sont les cas de faible module de Young, ce qui introduit un biais important dans le calcul de la moyenne. Le système de protéines purifiées sans aucune protéine de réticulation ("YP" sur la figure 8.3) se présente sous forme de gels très épais et très mous, où l'indentation est très forte lors d'une sollicitation de type rampe de force commandée de 2 à 80 mT. En conséquence le critère demandant une indentation maximale de 0,2  $\mu$ m pour un gel de 0,4 $\mu$ m d'épaisseur (d'après la relation (<u>épaisseur initiale mesurée - épaisseur mesurée au maximum de force fité</u>) < 0,5) élimine la plupart des courbes, par ailleurs sans problème apparent, tandis que le critère sur R2 permet de les conserver. Sur la figure 8.3, on constate nettement cet effet (cercles violets). On comprend bien que plus un gel est mou plus sa distribution est affectée par le phénomène. Ainsi, dans le cas du système purifié en l'absence de protéines de réticulation on peut mesurer une moyenne sur 45 points (critère R<sup>2</sup> > 0, 9) au lieu de seulement 14 (critère vd), 32 au lieu de



FIGURE 8.3 – Comparaison des critères de sélection des mesures pour différents types de gels : module élastique. Pour chaque condition, deux nuages de points sont représentés côte à côte et correspondent respectivement aux mesures du module élastique valides avec le paramètre R2 (gris, rouge, verts clairs) ou le paramètre vd (bleus, rose, verts foncés). Les points gris et bleus correspondent à des mesures sur le système purifié, rouges et roses sur l'extrait complet, et verts sur les extraits mutés sur les protéines de réticulation. Fit sur 100pN, vd = 1 ou R2>0.9. En noir, moyennes et erreur type.

24 en présence de 100nM de Sac6, ou encore, dans le cas du double mutant  $sac6abp140\Delta$  (dit "Sac6Abp140nulls" sur la figure), 50 au lieu de 37.

Globalement néanmoins, le critère sur R2 valide moins de points de mesure que le critère sur vd.

Sur la figure 8.4 on constate que l'hystérèse de chaque condition présentée ici n'est pas significativement différente quel que soit le critère de sélection des courbes choisi (mis à par pour le cas du système purifié sans protéines de réticulation et ce dernier s'explique très simplement par l'absence de statistique suffisante avec le critère vd : seulement 11 points disponibles).

Hysteresis - Comparaison of mutants for different crosslinkers with Wild Type 0.9 0.8 0 0.7 ၀ဇို . Oc 0.6 с 0 2 õ 0.5 ж Ж 0 ွစ်  $\mathcal{D}$ ÓP. ¢ 0.4 ₽ Æ 8 8 de ଡ ବ Ø 6 0.3 ۹ C  $\mathcal{O}$ 0 è e e 0.2 Ø Ф 0 00 0.1 0 YP1uMS6 WT Scp1null Sac6Abp140nulls Abp140null YP100nMS6 YP250nMS6 YP500nMS6 Sac6null ٧F Sac6Scp1nulls

FIGURE 8.4 - Comparaison des critères de sélection des mesures pour différents types de gels : hystérèse. Pour chaque condition, deux nuages de points sont représentés côte à côte et correspondent respectivement aux mesures de l'hystérèse valides avec le paramètre R2 (gris, rouge, verts clairs) ou le paramètre vd (bleus, rose, verts foncés). Les points gris et bleus correspondent à des mesures sur le système purifié, rouges et roses sur l'extrait complet, et verts sur les extraits mutés sur les protéines de réticulation. Fit sur 100pN, vd = 1 ou R2>0.9. En noir, moyennes et erreur type.

### 8.3 Caractérisation des gels reconstitués à partir d'extraits cellulaires de levure : compléments

### 8.3.1 Une mutation non liée à la structure des gels n'affecte pas la mécanique

Les mesures présentées sur les figures ci-dessous ont pour objectif de nous permettre de vérifier que les mutations infligées aux levures que nous utilisons n'ont pas d'autre effet que celui de modifier l'architecture des réseaux d'actine, et que le fait de réaliser une mutation en soi, puis deux, n'affecte pas les propriétés de la cellule en terme de mécanique. Idéalement nous devrions tester l'extrait de type sauvage (0 vs 1 mutation), un extrait simple mutant (1 vs 2 mutations), et un extrait double mutant (2 vs 3 mutations).



FIGURE 8.5 – Mutant  $aip1\Delta$ .

Nous avons peu de points de mesure sur des extraits fluorescents en général, étant passé très rapidement à l'utilisation d'actine de levure marquée. Cependant, nos points de mesure se disposent équitablement entre extraits fluorescents (Sla1-mcherry ou Abp1-gfp) et extrait non fluorescent pour le mutant  $aip1\Delta$ . Module de Young comme hystérèse présentent les même valeurs, même si nous avons peu de points. Cette comparaison a l'avantage d'être réalisée sur des mesures uniformément réparties dans le temps pendant la thèse pour les deux conditions.

### 8.3.2 Fluage

Au début de cette thèse nous avons tenté d'analyser l'hystérésis présentée par les réseaux d'actine branchée de levure en réalisant des expériences de fluage, ce type de mesure étant couramment utilisé en rhéologie des gels macromoléculaires.

L'utilisation d'un créneau de champ magnétique permet l'étude de la relaxation du système à force quasi-constante. L'objectif d'une telle mesure est typiquement d'établir le temps caractéristique de réarrangement d'un système visco-élasto-plastique. La figure ?? présente une comparaison de la réponse à un créneau de force entre le type sauvage et un mutant  $aip1\Delta$ . Si la pente de réponse des gels au saut de force initial était bien de forme exponentielle décroissante, la présentation des résultats dans un graphique semilog en temps devrait permettre de révéler un plateau. Or ici non seulement la réponse des gels présentent une pente non nulle dans ce type de représentation, mais de plus celle-ci est très variable d'un gel à l'autre.



FIGURE 8.6 − Courbes caractéristiques de réponse à un créneau de force pour l'extrait aip1∆ en rouge et le type sauvage en bleu. L'encart contient les courbes brutes (échelle non semi-logarithmique) et un schéma du créneau de force appliqué.

D'une manière générale, le mutant  $aip1\Delta$  présente le même type de décroissance linéaire de l'épaisseur avec le logarithme du temps sur plusieurs ordres de grandeurs, mais avec une pente moins importante que l'extrait de type sauvage. Une diminution de la capacité de réorganisation des réseaux par rapport au type sauvage pourrait entrainer un fluage moindre.

Nous avons cependant peu reproduit cette expérience, à cause de sa difficulté d'interprétation dans une géométrie de contact sphérique. Nous attendions de transposer notre système sur des cylindres afin d'étudier un fluage entre deux surfaces planes. Comme nous le verrons dans la partie perspective, je n'ai pas pu mettre un point un protocole de fonctionnalisation des cylindres qui me permette de faire croître des gels d'actine de levure à leur surface.

### Résumé / Abstract

Par ce travail expérimental, nous essayons d'établir un lien entre les propriétés mécaniques de gels d'actine branchés de levure et la composition biochimique des réseaux. L'actine est un polymère semi-flexible qui fait partie du cytosquelette. De nombreux partenaires protéiques de l'actine (notés ABPs par la suite) se lient aux filaments d'actine et les agencent en différents types de réseaux. Arp2/3 est un complexe protéique qui génère la croissance de réseaux d'actine branchés. Les réseaux d'actine branchés en croissance intéressent tout particulièrement physiciens comme biologistes car ils sont capables de développer des forces nécessaires à de nombreux processus vitaux pour la cellule, comme l'endocytose. Nous avons ici étudié les propriétés mécaniques de gels d'actine branchés reconstitués *in vitro*, en nous focalisant sur le rôle d'un type d'ABPs en particulier, les protéines de réticulation. Il nous a été possible de quantifier et de comparer l'effet de trois protéines de réticulation différentes sur la mécanique des réseaux d'actine branchés de levure.

Afin de mener à bien cette étude, nous avons combiné deux puissantes techniques expérimentales. Nous avons utilisé une technique de mesure des propriétés mécaniques basée sur l'utilisation de colloïdes superparamagnétiques développée au laboratoire. Cette technique permet de réaliser des mesures quantitatives et à haut débit sur des gels polymères très fins (quelques centaines de nanomètres d'épaisseur). Les réseaux ont été reconstitués *in vitro* grâce à la fonctionnalisation des billes superparamagnétiques avec Las17, une protéine que notre collaborateur biologiste a identifiée comme suffisant à activer Arp2/3 chez la levure. Nous avons de plus combiné deux approches complémentaires en travaillant à la fois sur des mélanges de quelques protéines purifiées. L'approche « top-down » est basée sur l'utilisation d'extraits cellulaires de mutants de la levure n'exprimant pas une ou des protéine(s) d'intérêt(s), et l'approche « bottom-up » sur l'addition de la protéine étudiée dans le système simplifié de quelques protéines purifiées.

*Mots clefs* : Actine. Endocytose. Réseaux branchés. Propriétés mécaniques. Arp2/3. Protéines de réticulation. Sac6. Scp1. Levure. Colloïdes superparamagnétiques.

In this experimental work we tried to quantify the mechanical properties of yeast branched actin networks with regard to their biochemical composition. Actin is a semi-flexible biopolymer that is assembled as part of the cytoskeleton. Proteins partners of actin (ABPs) shape its filaments into different type of networks. Arp2/3 is a protein complex that has the property to generate branched actin gels. Growing branched actin networks are of particular interest for both biologists and physicists because of their ability to generate forces necessary to many vital processes such as endocytosis. Here we study *in vitro* the mechanical properties of such networks, and we focus on the role of one type of actin binding proteins, the crosslinkers. This family of proteins appears to play a role in both the elastic, viscous and plastic properties of the gels. We are able to quantify and to compare the impact of three different crosslinkers on branched actin networks in yeast.

In order to conduct said study, we combined two powerful experimental methods. We used a superparamagnetic particle-based mechanical measurement technique that was developed in the lab and allows quantitative, high-throughput measurements on very thin gels. And the networks were reconstituted *in vitro* by functionalization of the magnetic particles with Las17, which has been showed to activate Arp2/3 for the yeast by our biologist collaborator. We furthermore worked on both yeast extracts containing all the ABPs of the Arp2/3 networks, and with sets of a few purified proteins, in order to combine a « top-down » (use of mutations in yeast to prevent the expression of protein(s) of interest) and a « bottom-up » (addition of a protein of interest in a simplified system) approaches.

 $Key \ words$ : Actin. Endocytosis. Branched networks. Mechanical properties. Arp2/3. Actinbinding proteins. Sac6. Scp1. Yeast. Superparamagnetic colloids.