

Table des matières

Remerciements	3
Préliminaire	11
I Introduction	13
I.A Modèles de mouvement cellulaire par contact avec un substrat	13
I.A.1 Modèle de motilité par tension de surface	13
I.A.2 Modèle de flux membranaire	14
I.A.3 Modèles impliquant la contraction corticale pour permettre la rétraction	15
I.A.3.a Modèle de contraction de la zone frontale et de cytoplasme viscoélastique	15
I.A.3.b Modèle de rétraction par contraction et de protrusion par forces osmotiques	16
I.A.3.c Modèle de rétraction par contraction et de protrusion par polymérisation d'actine	17
I.A.3.d Modèles de rétraction par contraction et de protrusion par pression hydrostatique	19
I.B Bases moléculaires des forces impliquées dans la motilité	21
I.B.1 Développement de forces protrusives par polymérisation du gel d'actine	21
I.B.1.a Biochimie de l'actine	21
I.B.1.b Modèles expliquant comment le processus de polymérisation peut créer une force	26

I.B.1.c	Modèle canonique de protrusion par polymérisation sur substrat 2D rigide	27
I.B.2	Contractilité et forces de pression	29
I.B.2.a	Contractilité du cytosquelette : rôle des myosines	29
I.B.2.b	Lien à la membrane et application de forces de pression	32
I.B.2.c	Protrusion « modèle » par pression hydrostatique : le phénomène de « blebbing »	34
I.B.3	Adhésion à l'environnement	39
I.B.3.a	Les molécules de l'adhésion cellulaire	39
I.B.3.b	Dépendance des mécanismes protruifs vis à vis du substrat	41
I.C	<i>Entamoeba histolytica</i> , un modèle de migration amiboïde	42
I.C.1	Motivations de l'étude	42
I.C.2	Biologie d' <i>E. histolytica</i>	43
I.C.3	Problématique et questions posées	46
II	Vers un modèle de la motilité cellulaire d'<i>Entamoeba histolytica</i>	47
II.A	Dispositif expérimental	47
II.B	Quel est le rôle du substrat ?	48
II.B.1	Le substrat est-il nécessaire à la mécanique de génération des protrusions ?	48
II.B.2	Effets de variation des propriétés du substrat	50
II.B.2.a	Variation des propriétés hydrophiles du substrat	51
II.B.2.b	Interactions électrostatiques	52
II.B.2.c	Interactions spécifiques	53
II.B.3	Visualisation des adhésions	54
II.B.4	Conclusions	54
II.C	Caractérisation globale de la migration	56

II.C.1	Relation entre dynamique protrusive et allure du déplacement quadratique moyen aux temps courts	56
II.C.1.a	Allure théorique du déplacement quadratique moyen pour une marche aléatoire	56
II.C.1.b	Comparaison entre déplacement quadratique moyen théorique et mesures antérieures	57
II.C.1.c	Hypothèse : dynamique « explosive »	57
II.C.1.d	Dynamique du centre de masse	60
II.C.1.e	Déplacement quadratique moyen aux temps courts	61
II.C.1.f	Conclusions	62
II.C.2	Détection des événements protrusifs et statistiques associées	63
II.C.2.a	Déplacement quadratique moyen aux temps longs	63
II.C.2.b	Décorrélation directionnelle	65
II.C.2.c	Variation d'aire au cours du temps : corrélation avec l'extension de protrusions, et mesure de durée du cycle protrusif	66
II.C.2.d	Carte des déplacements locaux de la cellule .	67
II.D	Détails des protrusions individuelles	69
II.D.1	Mesure des vitesses d'avancée de front	70
II.D.2	Mesure de la courbure locale des protrusions	71
II.D.3	Mouvement des organelles cytosoliques	72
II.D.4	Détails du développement d'une protrusion	73
II.D.5	Conclusions	77
II.E	Dynamique du cytosquelette lors de l'expansion des protrusions	78
II.E.1	Essais divers de visualisation du cytosquelette...	78
II.E.1.a	Fixation chimique	78
II.E.1.b	Cryo-microscopie à haute pression	79
II.E.1.c	Actine GFP	80
II.E.1.d	Marquage phalloïdine	81

II.E.1.e	Tests de microinjection de peptide LifeAct	81
II.E.1.f	Principe du plasmide LifeAct GFP	82
II.E.2	Résultats	83
II.E.2.a	L'élément initiateur de la protrusion est un détachement de la membrane	83
II.E.2.b	Quantification	83
II.F	Modèle	85
II.F.1	Ce que le modèle devra pouvoir expliquer	85
II.F.2	Modélisation des propriétés mécaniques de la cellule	85
II.F.2.a	Notations	85
II.F.2.b	Modèle	86
II.F.2.c	Ordres de grandeur des paramètres du modèle .	87
II.F.3	Compatibilité du modèle avec les observations	89
II.F.4	Mise à l'épreuve du modèle	92
III	Validations qualitatives et quantitatives du modèle de motilité par disjonction	93
III.A	Rôle global de la pression	93
III.A.1	Rôle global de la pression : investigations en jouant sur la perméabilité membranaire	93
III.A.2	Rôle global de la pression : investigations en jouant sur la pression osmotique	94
III.A.2.a	Choix des solutés utilisés pour les expériences d'osmolarité	94
III.A.2.b	Pression osmotique, principe théorique	95
III.A.2.c	Importance relative de la perméabilité	98
III.A.2.d	Mesure de τ' par application d'une surpression osmotique	98
III.A.2.e	Effet à $t < \tau'$ pour une surpression externe	100
III.A.2.f	Effets d'une dépression externe	100
III.A.2.g	Conclusion	101

III.B Rôle local de la pression	102
III.B.1 Application de forces locales via une micropipette, aspects qualitatifs	103
III.B.2 Relaxation de la contrainte à la jonction cytosquelette-membrane par perméabilisation locale	104
III.B.3 Conclusions	106
III.C Rôle de la contractilité	106
III.D Rôle du taux de renouvellement du cortex d'actine	107
III.E En simplifiant la géométrie, on obtient une régularisation des protrusions	109
III.E.1 Confinement dans des hydrogels	110
III.E.1.a Confinement par un gel d'acrylamide	110
III.E.1.b Confinement par un gel d'agarose, avec polymérisation induite par la température	112
III.E.2 Confinement 2D	112
III.E.3 Confinement dans un microcanal	113
III.E.3.a Principe	113
III.E.3.b Expériences	113
III.E.3.c Conclusion	115
III.E.4 Régularisation par manipulation avec micropipettes	117
III.E.4.a Régimes dynamiques théoriques	117
III.E.4.b Expériences	119
III.E.4.c Analyse par modélisation du régime oscillatoire	119
IV Conclusions et perspectives	123
A Culture cellulaire	127
B Traitement d'images	128
B.1 Détail de l'analyse pour le suivi du contours cellulaire complet .	128

B.1.1	Principe mis en oeuvre pour la segmentation d'images « ex nihilo »	128
B.1.2	Principe d'extraction des contours à partir d'images binaires segmentées	129
B.1.3	Principe de « régularisation » d'une courbe	129
B.1.4	Principe de reconstitution de trajectoires à partir de contours	130
B.2	Suivi de portions de contours à partir d'un bord initialisé par l'utilisateur	131
C	Détails de l'analyse du déplacement du centre de masse : absisse curviligne	132
D	Calcul théorique : centre de masse d'une protrusion en forme de portion de disque	136
E	Algorithme de détection automatique de protrusions individuelles	141
F	Synopsis des principales commandes Matlab utilisées	145
F.1	Gestion des données sous forme de « structures »	145
F.1.1	Structure film	145
F.1.2	Structure analyse	145
F.2	Commandes « macro » de gestion des films	146
G	Statistiques événements	148
H	Peptide Lifeact	149
	Références	151

Préliminaire

Les cellules animales présentent une variabilité extrême de formes, en relation avec leurs propriétés physiologiques ([Alberts *et al.*, 2002]). Ainsi, des cellules de fibroblastes sont fortement attachées à la matrice extra-cellulaire et montrent une morphologie aplatie, alors que des lymphocytes du sang périphérique sont peu adhérents et ont une forme sphérique ; des macrophages produisent nombre d'extensions dynamiques impliquées dans la reconnaissance de molécules étrangères, tandis que des cellules neuronales s'organisent en réseau via un raccordement complexe de dendrites et d'axones. En plus de cette variabilité de formes, beaucoup de types cellulaires modifient dynamiquement leur morphologie, spontanément ou en réponse à des changements environnementaux ; les cellules peuvent ainsi adapter leurs caractéristiques d'adhésion ou de polarité, ou réguler les contacts inter-cellulaires.

Dans de nombreuses conditions, les cellules ne doivent pas seulement adapter leur morphologie, mais également mettre en oeuvre des processus de motilité ([Bray, 2001]) : ainsi, pour divers microorganismes, se rapprocher d'une source de nourriture ou s'éloigner d'une zone néfaste ; pour des cellules immunitaires, combattre un pathogène ou éliminer des cellules déficientes ; ou encore, lors du développement embryonnaire, des mouvements complexes sont requis pour aboutir à la mise en place correcte des différents organes. Dans un environnement liquide, le déplacement d'un objet macroscopique peut se faire par natation (en utilisant l'inertie ou par asymétrie des organes propulseurs), ou en exerçant des forces sur un substrat ; mais lorsque l'on considère des objets d'une taille cellulaire, de l'ordre de la dizaine de microns, la contribution inertuelle devient négligeable en regard des contraintes visqueuses : on a donc soit une motilité en environnement liquide utilisant des organelles spécialisés, soit une motilité par contact avec un substrat visco-élastique.

La motilité cellulaire en environnement liquide est ainsi l'apanage de quelques types spécialisés (bactéries à flagelles, paramétries, spermatozoïdes...) ; pour se mouvoir par des processus de natation, les cellules ont donc développé des organelles spécialisés, flagelles ou cils ; ces deux structures utilisent astucieusement les forces de cisaillement pour aboutir à un mouvement résiduel : les flagelles bactériens par un mouvement hélicoïdal, les flagelles eucaryotes par un mouvement sinusoïdal¹, les cils par un battement périodique.

¹ceci surtout pour les spermatozoïdes ; les protozoaires qui ont un corps cellulaires nette-

Un grand nombre d'unicellulaires, qui ne sont pas capables de nager, se déplacent en exerçant des forces sur un substrat. Ce mode de locomotion est également le plus commun pour les cellules d'un organisme multicellulaire, qui doivent se frayer un passage au sein d'un tissus ou d'une matrice. Comprendre les bases physiques et moléculaires de ce type de motilité est d'une importance considérable pour l'ensemble des processus dans lesquels il intervient : développement, réponse immunitaire, invasions des tissus lors de la croissance tumorale ou de la dispersion métastatique, dissémination de pathogènes, ... C'est à certaines des questions ouvertes pour la compréhension de la motilité par contact avec un substrat que cette thèse tâchera de répondre.

Nous commencerons par décrire en introduction quels sont les différents modèles généraux de mouvement cellulaire par contact avec un substrat (section I.A), puis nous nous intéresserons aux bases moléculaires des forces à l'oeuvre dans les processus de motilité (section I.B) ; nous présenterons ensuite le modèle cellulaire, *Entamoeba histolytica*, qui a été étudié durant cette thèse, ainsi que les motivations de notre étude (section I.C). L'exposé des résultats est scindé en deux chapitres : le chapitre II présente les résultats préliminaires obtenus qui nous ont permis de mettre en place un modèle explicatif de la motilité d'*E. histolytica* ; le chapitre III est consacré aux test expérimentaux des paramètres de contrôle du modèle, de façon qualitative et dans la mesure du possible quantitative.

ment plus grand et donc une résistance visqueuse plus élevée ont développé des techniques plus complexes et très diverses.

Chapitre I

Introduction

I.A Modèles de mouvement cellulaire par contact avec un substrat

L'étude du mouvement cellulaire par contact avec un substrat est une des thématiques importantes de la biologie depuis le XIXème siècle (pour une perspective historique, voir notamment [Fukui, 1993] ou [Grebecki, 1994]) ; nous allons décrire dans cette section quelques modèles parmi les principaux qui ont été développés pour expliquer comment les cellules créent et utilisent des forces permettant un mouvement.

I.A.1 Modèle de motilité par tension de surface

Cette théorie de la motilité, l'une des plus anciennes puisqu'on en trouve déjà trace au XIXème siècle, est surtout connue via les travaux de Carter ([Carter, 1967]). Selon ce modèle, ce sont des effets de tension de surface qui provoquent la motilité cellulaire : ainsi, si l'on considère une surface pourvue d'un gradient d'adhésion, le bord cellulaire situé du côté le plus adhésif sera soumis à la tension d'étalement la plus forte, ce qui permettra à la cellule d'avancer de façon « passive », sans nécessiter de forces intracellulaire. Mais ceci ne suffit pas en soi pour expliquer le mouvement cellulaire sur une surface uniforme : pour ce faire, Carter ajoute la notion que la surface est modifiée au contact de la cellule, par exemple par simple adsorption locale de protéines cellulaires sécrétées ; alors, si l'adhésion est plus grande sur les surfaces non adsorbées, un mouvement cellulaire est capable de se perpétuer. Carter introduit également le fait que l'adsorption protéique serait transitoire, ce qui lui permet de proposer des explications pour des mouvements protruifs circulaires, ou pour des phénomènes de « ruffling ».

Certaines expériences de physico-chimie ont montré que des gouttes, dé-

posées sur un substrat solide en environnement gazeux, pouvaient acquérir un mouvement spontané dû à des propriétés d'hysteresis de mouillage entre l'avant et l'arrière (exemple des gouttes filantes, voir notamment [Dos Santos and Ondarcuhu, 1995]). Pour ce qui concerne des processus en environnement aqueux, une application *in vitro* a démontré que des vésicules chargées déposées sur une membrane de polarité opposée pouvaient bouger sur cette membrane par un phénomène de gradient de charge ([Solon *et al.*, 2006]), ce qui constitue une validation expérimentale de la faisabilité thermodynamique du processus proposé par Carter ; mais à ce jour, il n'y a aucune évidence expérimentale que ce processus de tension de surface joue un rôle quelconque dans la motilité cellulaire, et l'on attribue désormais à des composés internes à la cellule le rôle de production des forces motrices permettant la motilité ; l'adhésion ne joue alors qu'un rôle via la stabilisation des protrusions ou la transmission de forces (cf. section I.B.3).

I.A.2 Modèle de flux membranaire

Le modèle de motilité par flux membranaire est défendu principalement par Bretscher depuis les années 1980 ([Bretscher, 1984]). Le principe de ce modèle est décrit figure I.1 : l'exocytose membranaire est localisée à l'avant de la cellule, tandis que l'endocytose se produit sur tout le pourtour cellulaire ; le résultat est un flux lipidique en provenance de la protrusion frontale, auquel Bretscher attribue un rôle moteur pour permettre le mouvement cellulaire.

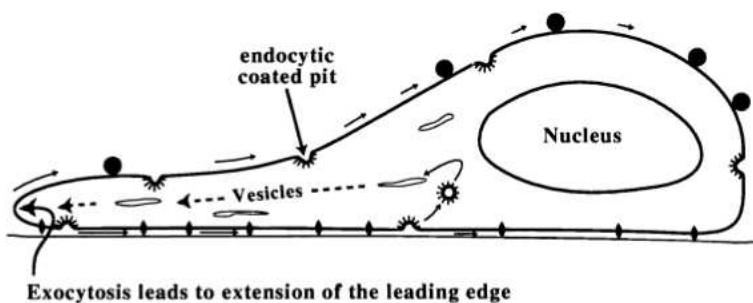


FIG. I.1: Modèle du flux lipidique, schéma repris de [Bretscher, 1996].

Cependant, un certain nombre d'expériences sont venues invalider ce modèle en ce qui concerne la migration de kératocytes ([Kucik *et al.*, 1990]), de leucocytes, ou chez *Dictyostelium* ([Traynor and Kay, 2007]) ; mais la question est semble-t-il toujours en débat pour ce qui concerne les fibroblastes ([Bretscher, 2008]).

I.A.3 Modèles impliquant la contraction corticale pour permettre la rétraction

J'englobe ici dans une même catégorie tous les autres modèles, car ceux-ci présentent pour caractéristique commune d'attribuer la rétraction et le mouvement du corps cellulaire principal à la contraction corticale ; hormis le modèle I.A.3.a qui place la contraction à l'avant, les autres modèles considèrent une contraction globale ou localisée à l'arrière de la cellule.

Si dans ces modèles la contraction permet la rétraction de l'arrière de la cellule, ceci ne présage pas du mécanisme permettant la protrusion de l'avant de la cellule : c'est donc essentiellement sur ce point que se font les différences, selon le mécanisme et la nature de la force qui permettent l'initiation et le développement des protrusions : les forces protrusives peuvent être de nature osmotique (section I.A.3.b), hydrostatiques (section I.A.3.d), ou produites par polymérisation du gel d'actine (section I.A.3.c).

I.A.3.a Modèle de contraction de la zone frontale et de cytoplasme viscoélastique

Ce modèle développé par Allen ([Allen, 1961]), est basé sur la contractilité de la zone frontale de l'endoplasme. Un argument essentiel qu'il invoque en faveur de ce concept, par rapport aux autres théories de l'époque, est qu'il permet de colocaliser la zone de contrôle du mouvement, et la zone où l'avancée de la cellule se produit. Allen postule ainsi que la rétraction de la zone caudale de la cellule est un processus passif, et que c'est la contraction de la zone frontale de l'endoplasme qui entraîne la motilité ; le cytoplasme est ici considéré comme un milieu viscoélastique, qui permet donc la transmission de la force (produite à l'avant de la cellule) vers l'arrière pour en permettre la rétraction (voir la figure I.2). Les auteurs n'abordent pas directement la question de la nature exacte de la force permettant le mouvement de la membrane à l'avant de la cellule : il semble qu'il s'agisse d'une pression hydrostatique résiduelle, mais ce point n'est pas décrit en détails.

Ce modèle, *a priori* assez spécifique à *Amoeba Proteus*, a connu un regain d'intérêt au tournant des années 90, avec l'observation de la présence de certaines myosines (comme la myosine I) dans les pseudopodes ([Condeelis, 1992]) ; cependant, on attribue aujourd'hui à ces myosines non-conventionnelles un rôle dans le transport actif des molécules nécessaires au front de protrusion, plutôt qu'à la production d'une force protrusive ([Bailly and Condeelis, 2002]).

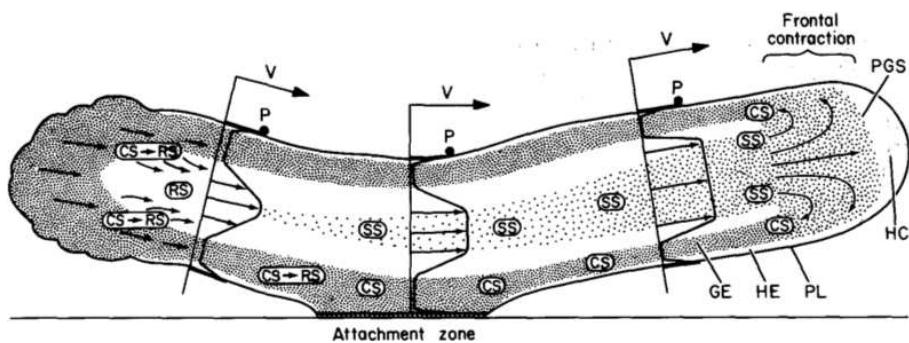


FIG. I.2: Modèle de contraction de la zone frontale, schéma repris de [Taylor *et al.*, 1973].

I.A.3.b Modèle de rétraction par contraction et de protrusion par forces osmotiques

Dans ce type de modèle, la force qui permet l'expansion des protrusions est attribuée à une pression osmotique : celle-ci se décline sous deux formes, d'une part la pression osmotique membranaire due à des flux de solvant à travers une membrane semi-perméable, d'autre part la pression liée à la solation d'un gel ([Oster, 1988]). Le « gonflement » osmotique d'un gel dense (en l'occurrence ici, l'actine) peut se produire si le gel est capable de s'imbiber d'eau ([Bray, 2001]), ce à quoi s'opposent les liaisons entre polymères ; la rupture des liaisons entre filaments, ou la dissociation des filaments eux-mêmes (par exemple par la gelsoline), pourrait alors provoquer un gonflement du gel à même d'entraîner l'extension d'un pseudopode. La figure I.3 montre comment un afflux de Ca^{2+} , par stimulation de la gelsoline, pourrait permettre une solation locale, et donc l'expansion d'une protrusion en réponse à un signal calcique.

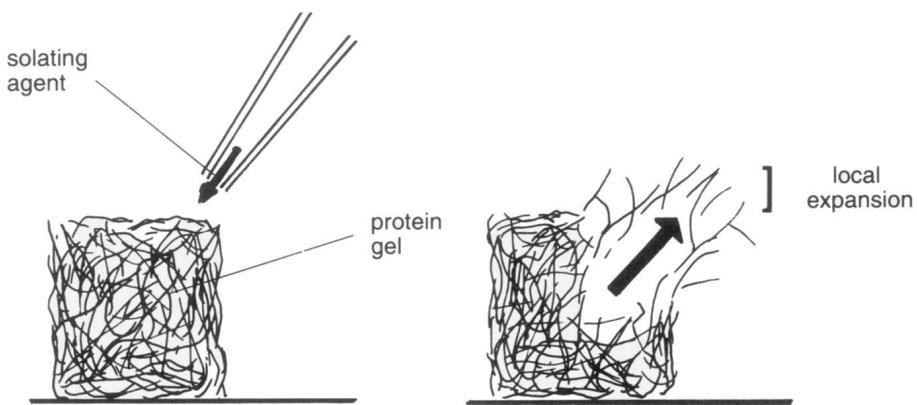


FIG. I.3: Mécanisme d'expansion corticale par solation d'un gel (d'après [Bray, 1992]).

Dans le détail, plusieurs modèles ont été proposés, avec selon les cas un cytoplasme considéré comme visqueux ([Herant *et al.*, 2003]), ou poroélastique ([Mitchison *et al.*, 2008]). Cependant, hormis le cas particulier de la réaction

acrosomiale lors de la fécondation (voir notamment [Tilney and Inoue, 1985] pour les spermatozoïdes de *Thyone*), les preuves expérimentales en faveur d'un rôle de la pression osmotique dans la génération de protrusions restent à ce jour spéculatives ([Herant *et al.*, 2003], [Verkman, 2005], [Mitchison *et al.*, 2008]).

I.A.3.c Modèle de rétraction par contraction et de protrusion par polymérisation d'actine

A partir des années 80, l'étude du mouvement de parasites bactériens intracellulaires, comme *Listeria* ([Tilney and Portnoy, 1989], et voir la figure I.4), a conduit à l'idée que la polymérisation d'un gel (en l'occurrence l'actine) pouvait créer des forces capable d'entraîner le mouvement cellulaire ([Theriot *et al.*, 1992]) ; cette hypothèse s'est vue confirmée par des expériences de reconstitution de motilité *in vitro* à partir de protéines purifiées, qui ont permis d'exclure définitivement un rôle des moteurs moléculaires de type myosine dans ce phénomène ([Loisel *et al.*, 1999]).

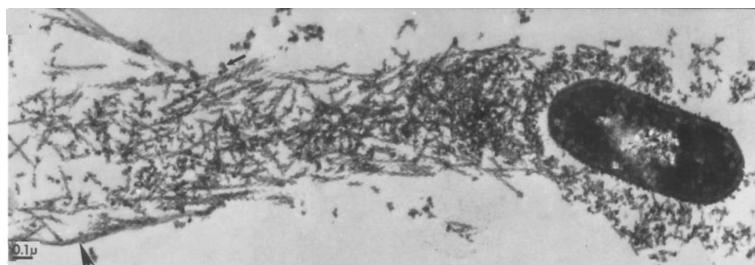


FIG. I.4: Image de microscopie électronique de *Listeria*, repris de [Tilney and Portnoy, 1989].

Le modèle complet à l'échelle d'une cellule, dont les bases ont été posées dans les années 1970 par Michael Abercrombie, décrit la motilité comme résultant d'un cycle de protrusion par polymérisation / contraction ([Bailly and Condeelis, 2002], et voir la figure I.5) :

1. la cellule se polarise, soit en réponse à un signal externe, soit spontanément par brisure de symétrie.
2. une protrusion se développe à l'avant de la cellule (différents types de protrusions sont possibles selon l'organisation du cytosquelette et les propriétés géométriques et mécaniques du substrat : lamellipode plat sur un substrat bidimensionnel rigide, filopodes, pseudopode tri-dimensionnel).
3. cette protrusion adhère au substrat.
4. l'ensemble du cortex est mis sous tension par contraction.
5. différentes options sont alors possibles :
 - si le résultat de la contraction est le détachement des points d'adhésion à l'arrière de la cellule, le cycle permet la motilité cellulaire, c'est le cas qui nous intéresse ici.

- en l'absence de détachement de l'arrière de la cellule, les forces produites peuvent permettre soit un remodelage de la matrice extracellulaire, soit des processus morphogénétiques via les forces appliquées sur les cellules voisines.

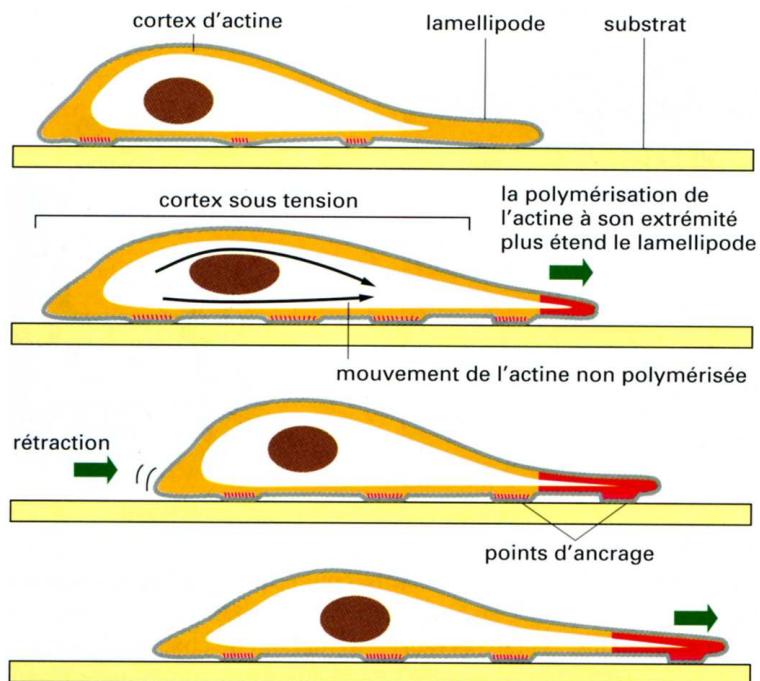


FIG. I.5: Motilité induite par polymérisation d'actine (schéma repris de [Alberts *et al.*, 2002]).

Ce modèle de motilité est certainement celui qui a connu le plus de développements à ce jour, notamment via l'étude des kératocytes (cf. figure I.6) qui en constituent un modèle d'étude cellulaire privilégié en raison de leur motilité très stéréotypée (forme stationnaire, vitesse constante, géométrie de la protrusion frontale réductible à une modélisation 2D voire 1D) ([Mogilner and Edelstein-Keshet, 2002]) : nous reviendrons plus en détails sur les mécanismes permettant le développement d'une protrusion de type lamellipode en section I.B.1.c. Cependant, pour des cellules dotées d'un mouvement moins stéréotypé que les kératocytes (par exemple des fibroblastes ou des neutrophiles), une compréhension détaillée et une modélisation fine s'annoncent beaucoup plus ardue : entre autre par la variabilité temporelle des formes cellulaires, avec très probablement une hysteresis significative, à la différence des kératocytes dont la forme est stationnaire ([Keren *et al.*, 2008]).

La question de savoir dans quelle mesure le modèle de la motilité des kératocytes *in vitro* peut être étendu à la motilité générale *in vivo* est à ce jour toujours ouverte : il est clair que la motilité *in vivo* est plus complexe que le modèle réductionniste du kératocyte, notamment en raison des propriétés géométriques, mécaniques et biochimiques des substrats ; cependant il y a de

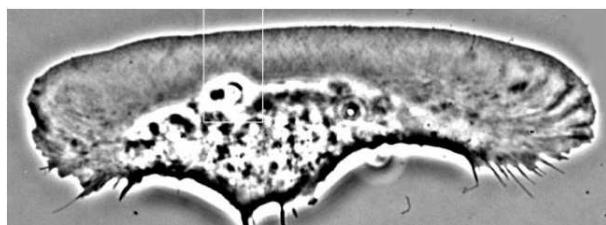


FIG. I.6: Kératocyte (repris de [Verkhovsky *et al.*, 2003]).

nombreuses évidences indiquant que les molécules et les réseaux biochimiques impliqués dans la motilité *in vitro* des kératocytes le sont également dans la motilité *in vivo*, et en ce sens la compréhension détaillée des processus de motilité à l'oeuvre pour les kératocytes est une étape utile, si ce n'est nécessaire ([Bailly and Condeelis, 2002]).

I.A.3.d Modèles de rétraction par contraction et de protrusion par pression hydrostatique

Ces modèles considèrent que c'est le cytosquelette qui, par contractilité, crée une pression hydrostatique, dont la relaxation permet l'avancée des protrusions (voir figure I.7) ; ainsi, dans ces modèles, à la différence du modèle de polymérisation d'actine (section I.A.3.c), la force contractile à l'oeuvre pour pousser le corps cellulaire agit également pour générer et développer la protrusion frontale. Selon les cas, la contraction est considérée comme globale, ou localisée à l'arrière de la cellule ; les différences se situent au niveau de la façon dont les protrusions sont initiées, c'est ce que nous allons discuter dans la suite de cette section.

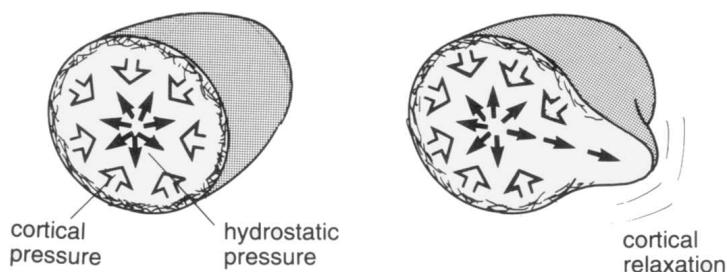


FIG. I.7: Principe général d'expansion d'une protrusion par pression hydrostatique (d'après [Bray, 2001]).

Le modèle du « gradient de pression » a été initialement introduit par [Mast, 1926], dans le contexte de la motilité amiboïde ; l'idée générale de ce modèle est que la contraction, dans la zone caudale de la cellule, du « cylindre ectoplasmique », crée un gradient de pression, lequel va entraîner un flux hydrodynamique permettant la progression de la cellule. Historiquement, ce modèle

a été contesté par les défenseurs du modèle de contraction de la zone frontale (décris précédemment section I.A.3.a), qui pour des raisons conceptuelles préféreraient colocaliser la région de progression avec la région productrice de forces, afin de simplifier la régulation du mécanisme.

Le modèle de couplage solation-contraction a lui été utilisé pour décrire au moins partiellement la relation entre structure cytoplasmique et production des forces au cours du mouvement amiboïde ([Janson *et al.*, 1991]). Le principe du modèle est que le couplage solation-contraction, processus auto-destructif, permet non seulement de maximiser la contraction à l'arrière, mais aussi de créer l'endoplasme qui est poussé en avant par une pression hydrostatique positive : ainsi le cortex se reforme à l'avant au fur et à mesure de la progression (modèle illustré par la figure I.8). Ce modèle considère *a priori* un cytosquelette épais (quelques centaines de microns), et s'applique donc essentiellement à des cellules de grande taille comme *Amoeba proteus*.

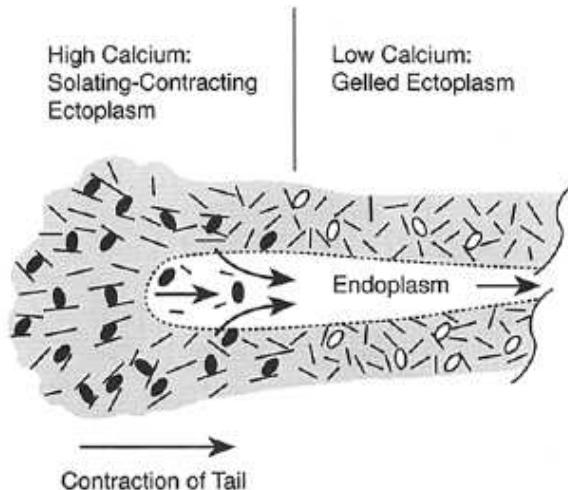


FIG. I.8: Modèle de solation-contraction appliqué aux protrusions amiboïdes (d'après [Janson and Taylor, 1993]).

Le modèle de la « contraction corticale généralisée » (ie. contractilité sur tout le pourtour cellulaire, et non seulement à l'arrière comme dans le modèle de contraction caudale) est lui présenté par [Grebecki, 1981] ; à l'époque, les auteurs avaient remarqué un comportement photophobe de l'amibe *Amoeba proteus*, et ils ont donc utilisé des stimuli lumineux locaux : l'avantage de cette technique était, pour l'époque, un contrôle en intensité bien meilleur que ce qui était possible avec des stimuli mécaniques, ainsi qu'une maîtrise de la localisation et de la durée d'application très nettement supérieure à des stimuli chimiques. La conclusion de [Grebecki, 1981] est que le mouvement des amibes dépend pour sa fonction motrice de l'activité contractile du cortex cellulaire entier, qui provoque une surpression intracellulaire relaxée par la progression de protrusions, et pour ses fonctions de contrôle et de guidage de l'ouverture ou de la fermeture de brèches dans l'enveloppe corticale, lesquelles deviennent

des fronts de progression.

Cependant, au tournant des années 90, la contribution des forces contractiles se voit reléguée à un rôle secondaire d'« ajustement fin » de la polarité cellulaire et de la motilité ([Condeelis, 1992]), suite à diverses expériences d'inhibition de la contractilité chez *Dictyostelium* (par inactivation de la myosine II) ; en effet les cellules ainsi traitées voient leur motilité réduite, mais elles continuent à générer des pseudopodes, ce qui conduit à l'époque à privilégier les modèles de motilité par polymérisation d'actine.

Cependant, les modèles de protrusion par pression hydrostatique vont connaître un regain d'intérêt via l'observation de protrusions, dites « blebs », dont le processus de formation indique clairement que leur développement n'est pas dû à des forces produites par la polymérisation d'actine : en effet, ces protrusions présentent au début de leur développement une membrane nue, sans cortex. Deux types différents de blebs ont été décrits ([Keller *et al.*, 2002]), selon que leur formation résulte d'une disparition locale du cortex, ou d'un détachement de la membrane par rapport au cytosquelette ; nous aborderons ces points plus en détails dans la section I.B.2.c.

I.B Bases moléculaires des forces impliquées dans la motilité

L'actine, qui forme un réseau dense en périphérie de la cellule (voir figure I.9), est connectée à la membrane et joue donc un rôle important dans le contrôle de la forme de la cellule et de ses propriétés mécaniques ; le « cortex » d'actine peut produire des forces protrusives (voir section I.B.1) ou contractiles (voir section I.B.2) ; l'adhésion à l'environnement (section I.B.3) permet de transmettre ces forces au substrat et de les convertir en mouvement effectif.

I.B.1 Développement de forces protrusives par polymérisation du gel d'actine

I.B.1.a Biochimie de l'actine

Les filaments d'actine, sont présents dans toutes les cellules eucaryotes et constituent une part importante du cytosquelette (l'actine représente 10 % du total des protéines dans les fibroblastes). Les filaments d'actine permettent notamment la constitution des microvillosités, mais jouent également un rôle majeur dans la motilité cellulaire, l'organisation de la cellule et le trafic intracellulaire.

L'actine présente des propriétés d'organisation dynamique tout à fait re-

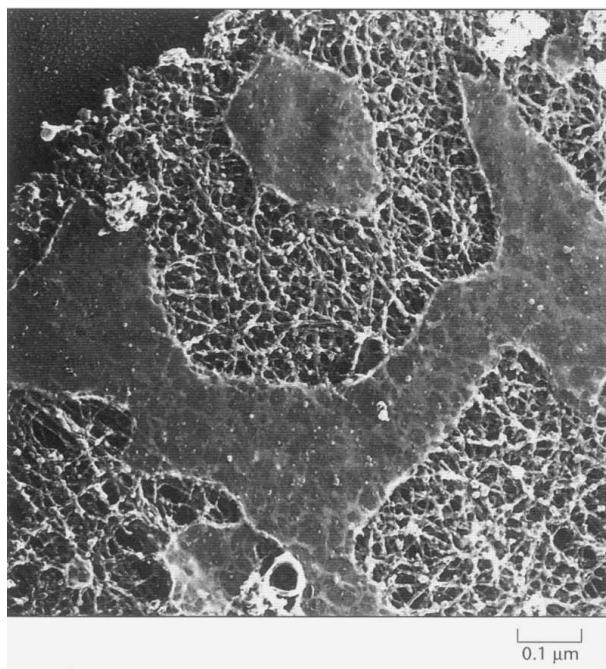


FIG. I.9: Micrographie du cortex cellulaire (repris de [Bray, 2001]) : obtenu par exposition de fibroblastes à une extraction partielle avec un détergent non-ionique, puis préparation de l'échantillon par refroidissement rapide ; les portions de la membrane plastique qui ont été dissoutes révèlent le réseau d'actine sous-jacent.

marquables, qui sont des éléments-clés de la compréhension de l'organisation du cytosquelette ([Pantaloni *et al.*, 2001], [Pollard and Borisy, 2003]). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'actine est une protéine très conservée au cours de l'évolution, ainsi l'actine d'*Acanthamoeba* ne diffère des actines de mammifères que de 15 acides aminés (sur 375).

Certains eucaryotes inférieurs, comme les levures, n'ont qu'un seul gène exprimant l'actine. Pour les eucaryotes supérieurs, plusieurs isoformes d'actine cohabitent, dont au moins six types pour les cellules de mammifères (répartis en différentes classes : α , β et γ).

Les monomères d'actine sont polaires, et ils s'assemblent « en file indienne », ce qui fait que le filament lui-même est polarisé macroscopiquement. On peut donc différencier les deux extrémités du filament (extrémités « plus » et « moins », respectivement « barbé » et « pointu »). Ces deux extrémités présentent des taux d'assemblage et de désassemblage de monomères différents (la polymérisation a lieu préférentiellement à l'extrémité « plus »), ce qui fait que dans une certaine gamme de concentration on a polymérisation à une extrémité et dépolymérisation à l'autre, donnant lieu au phénomène de « treadmilling » (sorte de « tapis roulant »).

Ajoutons que l'actine comporte un site de fixation de l'ATP (ou de l'ADP). La polymérisation utilise des monomères chargés d'ATP ; rapidement, l'ATP

est hydrolysé, mais le phosphate issu de l'hydrolyse n'est libéré que beaucoup plus lentement ; ainsi, la concentration locale dans le filament en monomères ATP/ADP+P/ADP constitue un indicateur de « vieillissement ».

Par ailleurs, l'auto-assemblage de polymères à partir de monomères est peu aisé, car les dimères et les trimères d'actine sont instables ([Pollard *et al.*, 2000]). La polymérisation est donc médiée par des nucléateurs protéiques, qui permettent à la cellule de réguler précisément les lieux d'assemblage des filaments : les deux principales classes ([Bindschadler and McGrath, 2004], [Carlier and Pantaloni, 2007]) sont le complexe Arp2/3, qui permet de nucléer un nouveau filament en le branchant sur un filament existant, et la formine, qui reste fixée au bout barbé et dont l'action y permet une polymérisation rapide ([Shemesh *et al.*, 2005], [Kovar, 2006], et voir la figure I.10) ; signalons que d'autres nucléateurs ont été découverts récemment (Spire et Cobl, [Renault *et al.*, 2008]).

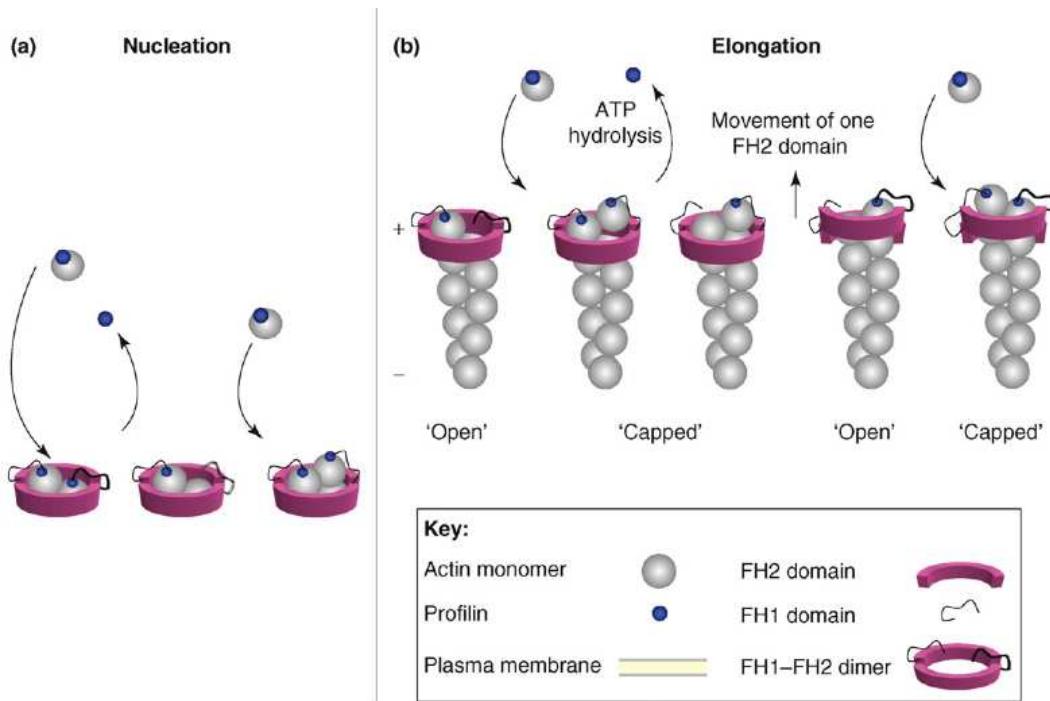


FIG. I.10: Modèle du fonctionnement de la formine pour l'assemblage d'un filament d'actine (d'après [Renault *et al.*, 2008]). a). la formine facilite la nucléation par stabilisation de dimères. b). élongation processive à partir du bout barbé en utilisant des monomères d'actine-profiline.

Un point essentiel pour permettre la motilité via la polymérisation d'actine est de contrôler de façon spatiale très précise le lieu de la polymérisation ; or l'actine comporte un très grand nombre de partenaires protéiques (voir la figure I.11 pour un aperçu) : des expériences *in vitro* ont permis de déterminer quels sont les composés essentiels nécessaires *a minima* pour permettre la motilité :

- pour la motilité induite par Arp2/3 : l'ADF/cofiline, des protéines coif-

fantes et une activation locale d'Arp2/3 sont nécessaires ([Loisel *et al.*, 1999]) ; la présence de profiline permet une augmentation de vitesse notable.

- pour la motilité induite par les formines : l'ADF/cofiline et la profiline sont essentiels ([Romero *et al.*, 2004]). *In vivo*, les formines doivent être activées par de petites GTPases ([Lammers *et al.*, 2008]), mais *in vitro*, les sous-domaines FH1-FH2 des formines permettent seuls la nucléation sans processus d'activation supplémentaire.

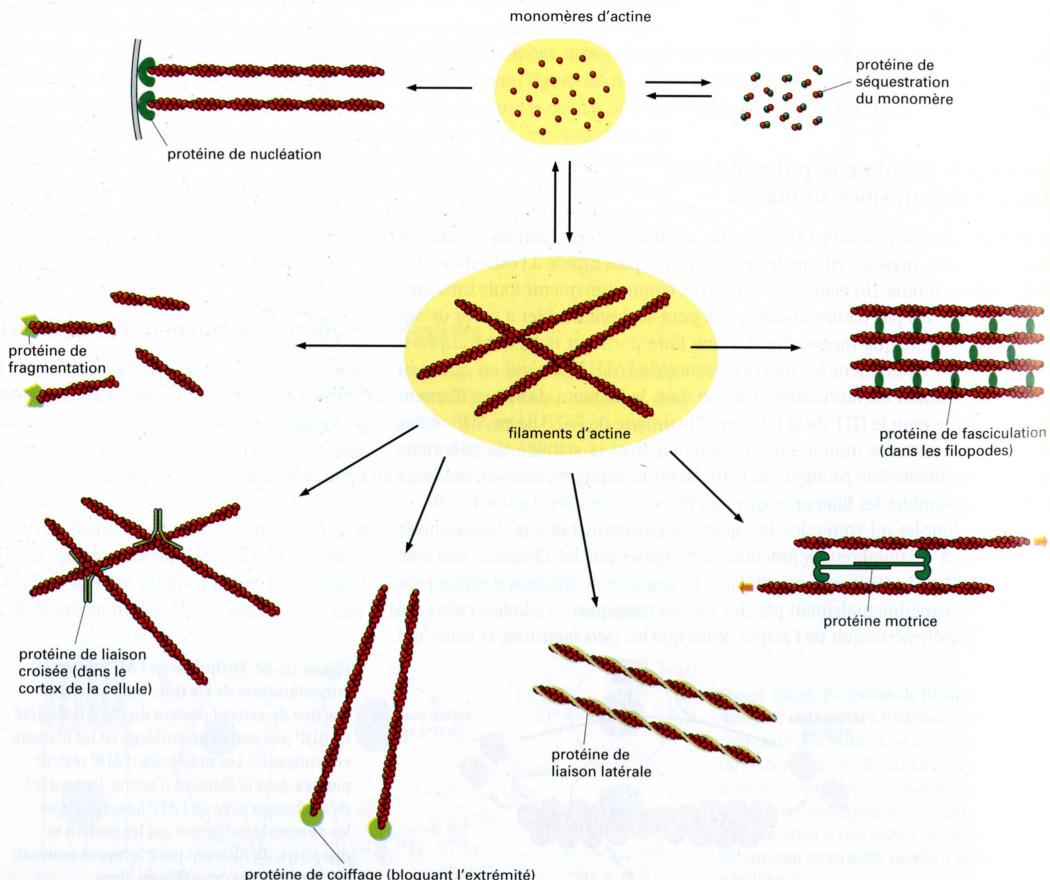


FIG. I.11: Principales classes de protéines liant l'actine présentes dans les cellules des vertébrés (d'après [Alberts *et al.*, 2002]).

Décrivons brièvement le rôle de ces protéines :

- la profiline s'associe aux monomères d'actine pour catalyser l'échange de l'ADP contre de l'ATP, et ainsi reconstituer le stock de monomères d'actine-ATP, qui sont consommés au fur et à mesure de la polymérisation.
- l'ADF/cofiline agit sur les polymères d'actine pour les scinder et entraîner leur dépolymérisation ; son affinité est deux ordres de grandeur supérieure pour l'actine-ADP que pour l'actine-ATP, ce qui fait qu'elle dépolymérise préférentiellement l'actine « ancienne ».
- les protéines coiffantes se fixent de façon durable aux extrémités barbées des filaments d'actine, interrompant la polymérisation.

- les protéines WASP et WAVE sont des régulateurs de la polymérisation médiée par Arp2/3 ([Takenawa and Suetsugu, 2007]).

Ainsi, la profiline et l'ADF/cofiline permettent d'accélérer le cycle de polymérisation, point essentiel pour permettre une motilité effective aussi bien pour la polymérisation médiée par la formine que pour Arp2/3.

Les protéines coiffantes ont elles une rôle régulateur essentiel dans le processus de contrôle du réseau dendritique créé par une polymérisation médiée par Arp2/3 ; en effet, Arp2/3 est un complexe stable de 7 sous-unités protéiques, parmi lesquelles Arp2 et Arp3 ([Goley and Welch, 2006]) : ce complexe, en se liant sur le côté d'un filament d'actine existant, acquiert la capacité de nucléer un nouveau filament, à 70° du précédent, donnant lieu à la polymérisation d'un réseau organisé ([Mullins *et al.*, 1998]) : cette action combinée avec les protéines citées précédemment permet de créer une protrusion, par polymérisation locale d'un réseau dendritique (cf. figure I.12). Pour expliquer l'orientation des filaments dans le lamellipode, [Maly and Borisy, 2001] a proposé un mécanisme d'auto-organisation par sélection naturelle de l'orientation des filaments.

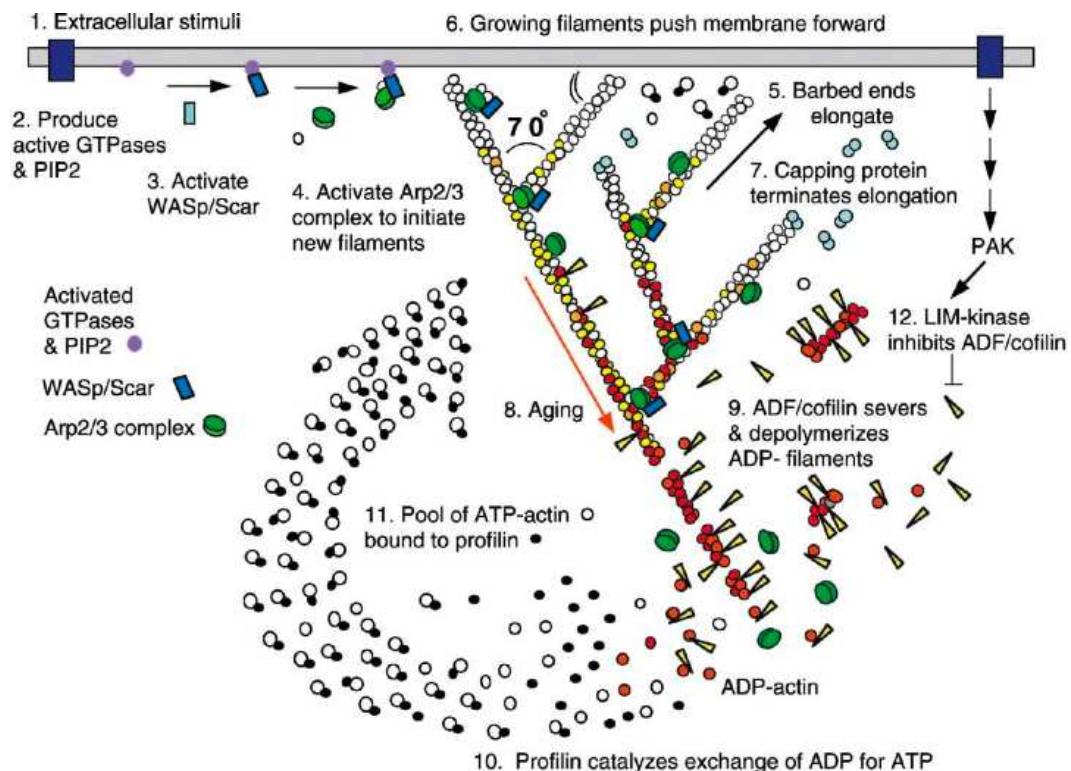


FIG. I.12: Le modèle dendritique : comment l'activation localisée de Arp2/3, coordonnée à l'action des principales protéines interagissant avec l'actine, permet de donner lieu à une protrusion (d'après [Pollard and Borisy, 2003]).

I.B.1.b Modèles expliquant comment le processus de polymérisation peut créer une force

La modélisation quantitative permet de comprendre comment la thermodynamique peut rendre compte des forces développées lors de la polymérisation ([Borisy and Svitkina, 2000], [Mogilner, 2006], [Mogilner, 2009]). La théorie du « cliquet thermique » ([Peskin *et al.*, 1993]) modélise la force due à des polymères rigides contre un objet : le principe de ce modèle est que l'objet situé devant les polymères au front de polarisation est animé d'une diffusion thermique ; lorsqu'il y a un espace suffisant pour permettre l'intercalation, un monomère peut s'ajouter sur le front de polymérisation, ce qui empêche la diffusion rétrograde de l'objet. Cependant, la comparaison avec l'expérience a montré que la diffusion thermique de l'objet poussé est généralement insuffisante pour rendre compte des vitesses observées, de sorte qu'il faut également considérer les fluctuations thermiques du gel. Le cas de polymères flexibles est traité par le modèle de « cliquet thermique élastique » ([Mogilner and Oster, 1996]) : dans ce cas, ce sont les fluctuations thermiques des filaments qui créent l'espace nécessaire à l'intercalation de nouveaux monomères au niveau du front de polymérisation (voir figure I.13). Remarquons que dans ces modèles, l'hydrolyse de l'ATP n'est pas utilisée comme source d'énergie directe pour développer la force, mais elle est nécessaire au processus de dépolymérisation asymétrique des filaments.

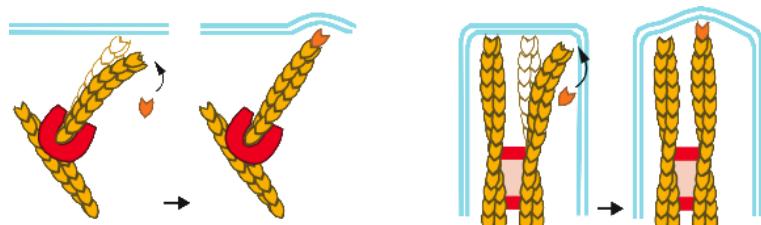


FIG. I.13: Modèle du cliquet thermique élastique (adapté de [Borisy and Svitkina, 2000]). A gauche : cas d'un lamellipode où les filaments sont organisés en un réseau dendritique ; à droite : cas d'un filopode où les filaments sont organisés en faisceau parallèle.

La théorie du cliquet thermique élastique prédit que la polymérisation d'un filament unique pourrait entraîner des forces de l'ordre du pN, en bon accord avec les mesures expérimentales ; une autre prédition est que la longueur optimale des filaments doit être de quelques centaines de nm : trop courts, ils seraient trop rigides pour produire efficacement une force ; trop longs, la force de protrusion décroît fortement car il devient énergétiquement plus favorable de les courber. Un autre aspect est qu'il y a un angle d'incidence optimal des filaments par rapport au plan de polymérisation : si les filaments sont parallèles au plan de polymérisation, ils peuvent certes croître rapidement mais sans exercer une force protractrice effective ; et les filaments orthogonaux au plan de protrusions sont, eux, défavorisés car il leur faut attendre des fluctuations plus

fortes que leurs homologues pour avoir un espace suffisant pour l’intercalation d’un monomère.

Un modèle ultérieur a été développé pour prendre en compte le fait qu’une partie des filaments puissent être attachés à la surface poussée par le gel : ce modèle de « cliquet attaché » ([Mogilner and Oster, 2003]) fait l’hypothèse que les filaments s’associent de façon transitoire à la membrane, s’en dissocient rapidement et polymérisent jusqu’à ce qu’ils soient coiffés par une protéine coiffante et perdent ainsi le contact avec la membrane. Durant ce processus, les filaments attachés sont sous tension, générant une résistance effective et une friction, tandis que les filaments dissociés sont en compression, entraînant la force de poussée.

Un modèle alternatif de protrusion ([Dickinson and Purich, 2002]) propose que les filaments en croissance soient couplés à un moteur protéique associé à la surface qui permet la polymérisation ; ce modèle pourrait permettre d’expliquer la production de forces plus élevées, et une gamme de relations force-vitesse plus diverses que ce qui est permis par les modèles de cliquet.

D’autres modèles ont mis l’accent sur les propriétés de stress élastique : ainsi [Gerbal *et al.*, 2000] (voir aussi [Bernheim-Grosbasser *et al.*, 2005]), qui s’intéresse plus particulièrement au mouvement de type *Listeria*, procède à une analyse au niveau mésoscopique, ce qui lui permet d’inclure les propriétés élastiques du gel et de rendre compte du mouvement de « stick-slip » ; une voie de recherche importante dans les années à venir est clairement le couplage de tels modèles mésoscopiques, qui ne font pas d’hypothèse particulière sur l’origine microscopique des forces de polymérisation, avec les modèles microscopiques de production de force décrits précédemment dans cette section.

I.B.1.c Modèle canonique de protrusion par polymérisation sur substrat 2D rigide

Le lamellipode est une protrusion plate, observée lors de la motilité sur un substrat rigide (cf. figure I.5) ; plus précisément, on distingue deux sous-régions dans la protrusion : le lamellipode et la lamelle ([Chhabra and Higgs, 2007], et voir figure I.14) : le lamellipode est situé sur le front de la protrusion, et s’étend sur une distance de quelques microns ; on trouve alors la lamelle, qui s’étend du lamellipode jusqu’au corps cellulaire. Le lamellipode est plus fin (100 à 160 nm d’épaisseur contre plus de 200 nm pour la lamelle), moins adhérent et plus dynamique ; il est à présent établi que le lamellipode n’est que faiblement adhérent, et que les adhésions stables ne commencent qu’à la frontière entre le lamellipode et la lamelle. L’organisation des réseaux d’actine est également différente entre les deux structures : au niveau du lamellipode, l’actine est organisée sous forme d’un réseau branché impliquant Arp2/3, ce qui est en bon accord avec le modèle de nucléation dendritique (précédemment décrit figure I.12) ; *a contrario*, le réseau d’actine dans la lamelle présente une organisation

moins bien définie, avec une régularité de branchement bien moindre, et des filaments plus longs : on connaît mal les processus de nucléation des filaments dans la lamelle, lesquels ne dépendraient pas de Arp2/3, mais potentiellement de formines.

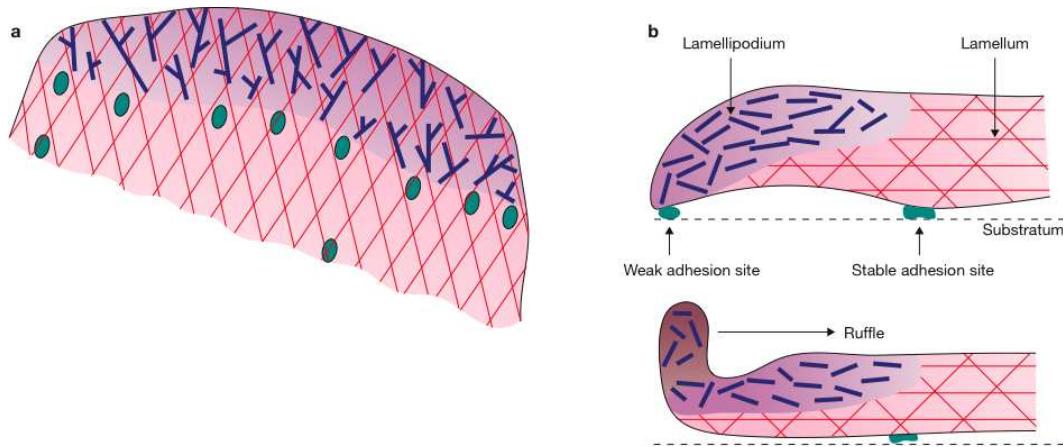


FIG. I.14: Lamellipode / lamelle (adapté de [Chhabra and Higgs, 2007]).

Comme nous l'avons brièvement évoqué section I.A.3.c, la motilité des kératocytes avec leur lamellipode frontal a été un objet d'étude privilégié pour la modélisation, puisque la forme quasi-2D du lamellipode/lamelle simplifie notablement le problème par rapport à d'autres cas tridimensionnels. Une des premières tentatives en ce sens est le modèle phénoménologique de [Lee *et al.*, 1993], dit « modèle d'extension radiale graduée », avant tout basé sur des considération géométriques et cinétiques, et qui donc ne propose pas d'explication pour les mécanismes dynamiques sous-jacents. [Mogilner and Edelstein-Keshet, 2002] propose un modèle basé cette fois sur des processus microscopiques explicites, en l'occurrence le cliquet thermique élastique, ce qui permet des prédictions quantitatives entre dynamique microscopique et motilité macroscopique ; néanmoins les auteurs ont dû simplifier la géométrie à un modèle 1D. D'autres modèles ont été développés pour mieux prendre en compte la géométrie du lamellipode, citons notamment [Grimm *et al.*, 2003] et [Kruse *et al.*, 2006].

Notons que pour le cas particulier du mouvement du lamellipode des cellules de sperme de nématode, des modèles alternatifs ont été proposés, par exemple [Joanny *et al.*, 2003] : dans ce cas c'est un gradient auto-généré de pH qui permet de créer une asymétrie dans le lamellipode ; de ceci découle une localisation spatiale des processus de polymérisation (à l'avant) / dépolymérisation (à l'arrière), ainsi que la création de stress dans le gel qui aboutit à la rupture des adhésions à l'arrière du lamellipode (l'hypothèse étant que le pH influence l'état de gonflement du gel) : le tout permet le mouvement du lamellipode.

Le développement d'outils biophysiques permet de tester quantitativement les prédictions des différents modèles proposés pour expliquer la motilité du

lamellipode : ainsi [Prass *et al.*, 2006] se livre à une mesure directe de la force protrusive du lamellipode, qui pointe le fait que les modèles existants ne rendent pas compte correctement de la relation force-vitesse mesurée expérimentalement ; ceci conduit d'ailleurs les auteurs à proposer l'existence de mécanismes complémentaires à la polymérisation d'actine dans la protrusion du lamellipode, l'une étant la contribution d'une faible pression hydrostatique.

Plus récemment, [Keren *et al.*, 2008] a proposé un modèle complet de la motilité des kératocytes, basé sur le *treadmilling* (auto-renouvellement séquentiel) du gel d'actine, dans un cadre de membrane inextensible ; cependant la relation force-vitesse d'expansion du gel est prise telle-quelle à partir des données expérimentales, sans qu'elle soit appuyée par un modèle microscopique, ce qui relativise la portée prédictive de ce modèle.

On remarquera donc que malgré sa « simplicité » apparente, le modèle de motilité du kératocyte comporte encore nombre de zones d'ombre avant d'arriver à une compréhension complète des mécanismes permettant sa motilité.

I.B.2 Contractilité et forces de pression

I.B.2.a Contractilité du cytosquelette : rôle des myosines

La famille des myosines regroupe les protéines qui partagent un domaine protéique particulier, connu pour interagir avec l'actine, hydrolyser l'ATP et produire un mouvement ; les analyses phylogénétiques ont subdivisé les myosines en classes : les myosines « conventionnelles »¹ de classe II, étudiées initialement pour leur rôle dans les cellules musculaires, et les autres classes de myosines « non-conventionnelles » (plus d'une quinzaine), pour la plupart d'entre elles encore mal connues ([Sellers, 2000]). Dans la suite de cette section, nous nous restreindrons à l'étude de la myosine II, à qui est attribuée l'essentiel des forces contractiles dans les cellules non-musculaires ([Bray, 2001]).

Les molécules de myosine II sont des dimères, chacun d'eux étant constitué d'une « tête », qui constitue le domaine moteur de liaison à l'actine et d'interaction avec l'ATP, et d'une « queue » qui par super-enroulage permet la dimérisation (figure I.15.a). Les myosines II sont de plus capables de s'associer entre elles pour former un macro-complexe, également appelé filament épais (figure I.15.b).

Le fonctionnement du cycle moteur de la myosine II est à présent bien connu (voir figure I.16.a, et [Spudich, 2001]) : la tête de la myosine se lie à l'ATP, ce qui permet à la tête de se détacher du filament d'actine ; l'ATP est alors hydrolysé, ce qui entraîne un changement conformationnel qui prépare l'étape motrice ; le ré-attachement au filament d'actine entraîne la libération du phosphate issu de l'hydrolyse et le changement conformationnel moteur,

¹désignées ainsi car pendant des décennies, ce fut le seul groupe de myosines connu.

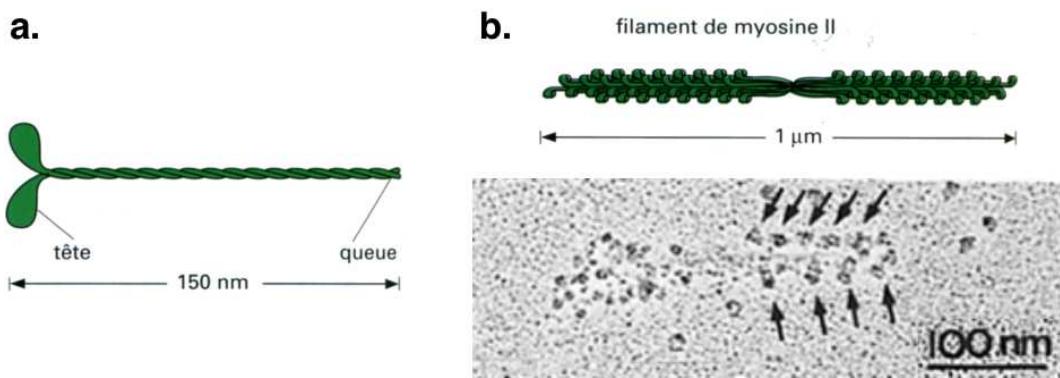


FIG. I.15: a). Molécule de myosine II (extrait de [Alberts et al., 2002]). b). Filament épais de myosines II (schéma extrait de [Alberts et al., 2002] et micrographie électronique reprise de [Pagh and Gerisch, 1986]).

dont l'effet est un déplacement relatif par rapport au filament de 5 à 15 nm. On notera également que la molécule ne passe qu'une faible proportion du cycle attachée au filament d'actine et constitue ainsi un moteur peu processif : l'efficacité de la myosine est donc intimement liée au travail collaboratif de plusieurs moteurs sous forme de filament épais (figure I.15.b), lequel permet, par association de plusieurs moteurs, de créer une force collective de glissement entre deux filaments (figure I.16.b).

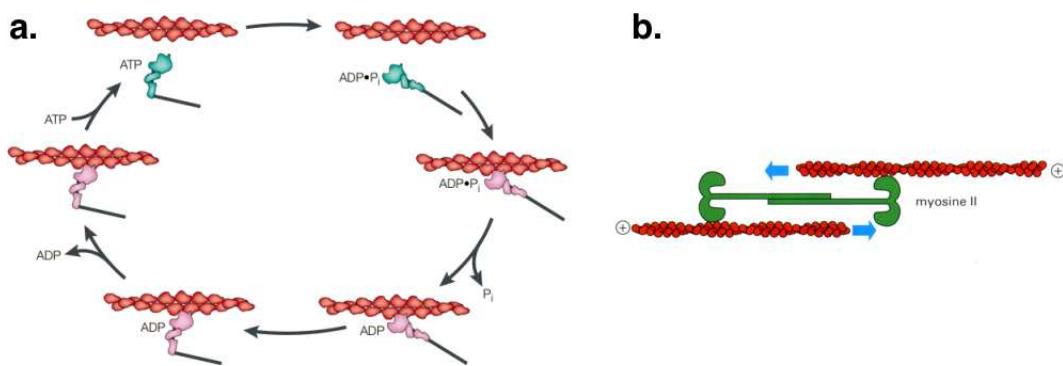


FIG. I.16: a). Cycle moteur de la myosine II (extrait de [Spudich, 2001]). b). Un filament épais de myosine II permet de faire glisser l'un par rapport à l'autre deux filaments d'actine (extrait de [Alberts et al., 2002])

La question est maintenant de savoir quelles sont les conséquences mécaniques au niveau macroscopique de l'activité des filaments épais de myosines dans un réseau d'actine isotrope. Intéressons-nous pour commencer à la rhéologie d'un gel d'actine seul : dans ce type de gel, la longueur des filaments et leur longueur de persistance sont nettement supérieures à la maille du réseau, de sorte que les mouvements aux temps courts d'un filament sont confinés dans un tube délimité par l'espace laissé entre les chaînes voisines (cf. figure I.17, et [Le Goff, 2002]) ; soit L_e la longueur d'enchevêtrement, que l'on définit

nit comme la longueur moyenne de contour entre deux points de collision du filament avec son tube ; alors les déformations de longueur inférieure à L_e ne seront pas affectées par l'enchevêtrement et relaxeront rapidement, tandis que les déformations de longueur supérieure à L_e seront contraintes par les filaments environnants, et ne pourront relaxer que par « reptation » du filament dans son tube. Les conséquences en sont un comportement élastique sur une large gamme de fréquences (10^{-3} à 10 Hz), et fluide à très basse fréquence.

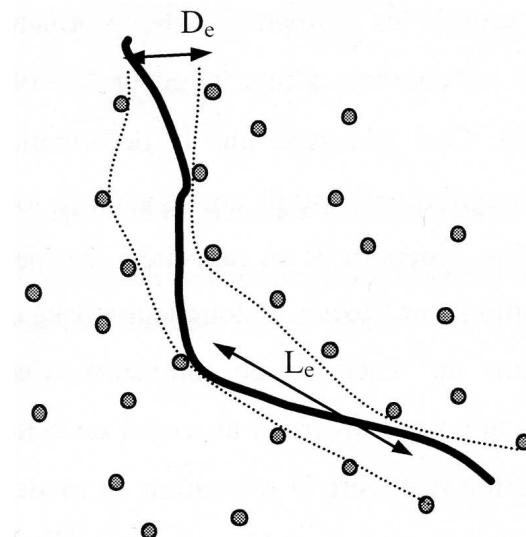


FIG. I.17: Tube de reptation pour un filament d'actine dans un gel (extrait de [Le Goff, 2002]).

Si l'on rajoute à présent l'activité de filaments épais de myosines, leur action va fortement accélérer le mouvement longitudinal des filaments par glissement local entre filaments ([Le Goff *et al.*, 2002]), de sorte que la relaxation du stress est considérablement accélérée ([Humphrey *et al.*, 2002] et figure I.18.a). Ainsi, dans un tel gel à deux constituants (actine + myosine), l'activité des myosines est d'augmenter la fluidité du gel.

Pour comprendre le processus de contractilité dans un gel par action des myosines, il faut considérer un troisième composé, les protéines réticulantes : en effet, leur action de réticulation bloque les modes de dissipation par diffusion longitudinale des filaments dans leur tube de reptation, ce qui a pour conséquence macroscopique une rigidification du gel ; [Wachsstock *et al.*, 1994] a montré que les propriétés des réticulants (temps de vie, résistance) influencent fortement les propriétés mécaniques du gel : ainsi les réticulations permanentes (par ex. par liaisons streptavidine-biotine) rigidifient le gel, avec pour conséquence un comportement élastique sur une grande gamme de fréquences ; alors que l'introduction de réticulations dynamiques (par exemple l' α -actinine) au temps de vie fini, ne va rigidifier la solution que pour les temps caractéristiques inférieurs au temps de vie de la liaison.

Ainsi, lorsqu'on considère un système à trois composés (filaments d'actine,

réticulant et myosines), l'action des moteurs entraîne une force contractile entre les points de réticulation du gel (figure I.18.b), qui entraîne un stress contractile macroscopique du gel ([Mizuno *et al.*, 2007]).

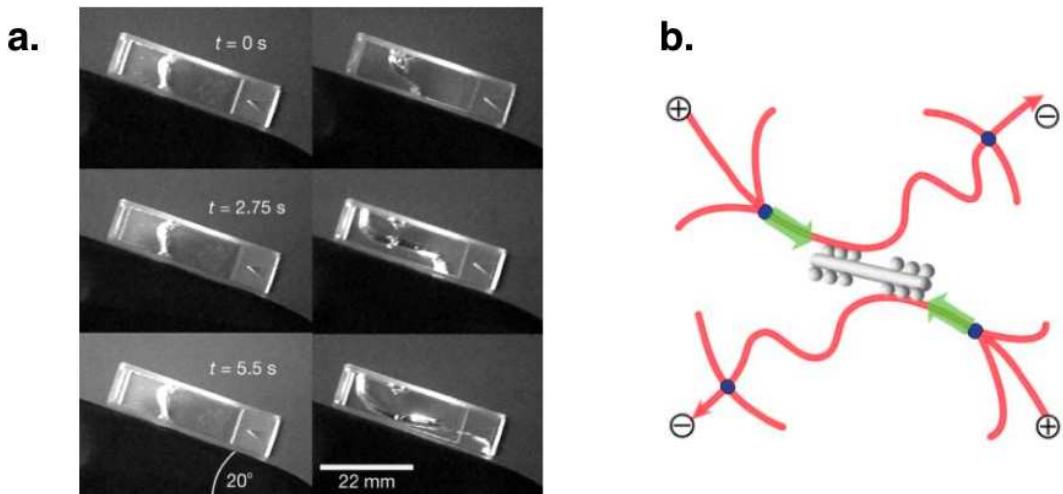


FIG. I.18: a). Gel composé de deux constituants, actine + myosine II; à $t=0\text{ s}$, la cuvette est renversée : le gel dans lequel les myosines II sont inactives (à gauche) a un comportement solide sur la durée de l'expérience, tandis que le gel dans lequel les myosines II sont actives (à droite) a le temps de s'écouler partiellement (extrait de [Humphrey *et al.*, 2002]). b). Principe de contraction d'un gel d'actine par action des myosines entre les points de réticulation (extrait de [Mizuno *et al.*, 2007]).

I.B.2.b Lien à la membrane et application de forces de pression

Nous avons vu au paragraphe précédent I.B.2.a comment l'action des myosines formait un stress contractile dans un gel d'actine; pour convertir ce stress en une pression hydrostatique permettant la motilité décrite à la section I.A.3.d, il faut transmettre cette contrainte à l'équivalent d'un « piston » physique, en l'occurrence - pour une cellule - sa membrane : ce lien entre les filaments d'actine et la membrane peut être assuré par des molécules variées, dont nous allons à présent décrire les modes d'action.

Un premier mode de liaison à la membrane est via une liaison aux phospholipides ([Sheetz *et al.*, 2006]) ; parmi ceux ci, les phosphoinositides² jouent un rôle majeur : ils sont présents sur le feuillet interne en faible proportion, mais leur quantité est très précisément régulée, notamment les proportions de PIP₂ et PIP₃. Un des principaux domaines protéiques permettant la liaison aux PIPs est le domaine PH (« pleckstrin homology ») qui va présenter une affinité spécifique pour PIP₂ et/ou PIP₃, permettant ainsi une réponse spécifique à une signalisation biologique ([Lemmon, 2008]). Parmi les protéines interagis-

²créés par phosphorylation de phosphatidylinositol en position 3, 4 ou 5.

sant directement avec les lipides et impliquées dans une liaison aux filaments d'actine, citons la vinculine, l'annexine et l' α -actinin ([Niggli, 2005]).

D'autres domaines protéiques permettent également une liaison via l'interaction avec des protéines membranaires : l'exemple le plus connu est sans doute le domaine FERM présent chez les protéines ERM (ezrine, radixine et moesine). Les protéines ERM présentent à leurs extrémités d'une part le domaine FERM, d'autre part un domaine de liaison à l'actine ([Niggli and Rossy, 2007]) ; les protéines inactives sont en configuration repliée, qui masque les deux domaines d'interaction ; mais via une activation par PIP₂, la protéine s'ouvre et expose ainsi ses domaines d'interaction qui lui permettent une liaison entre la membrane et le cytosquelette (figure I.19).

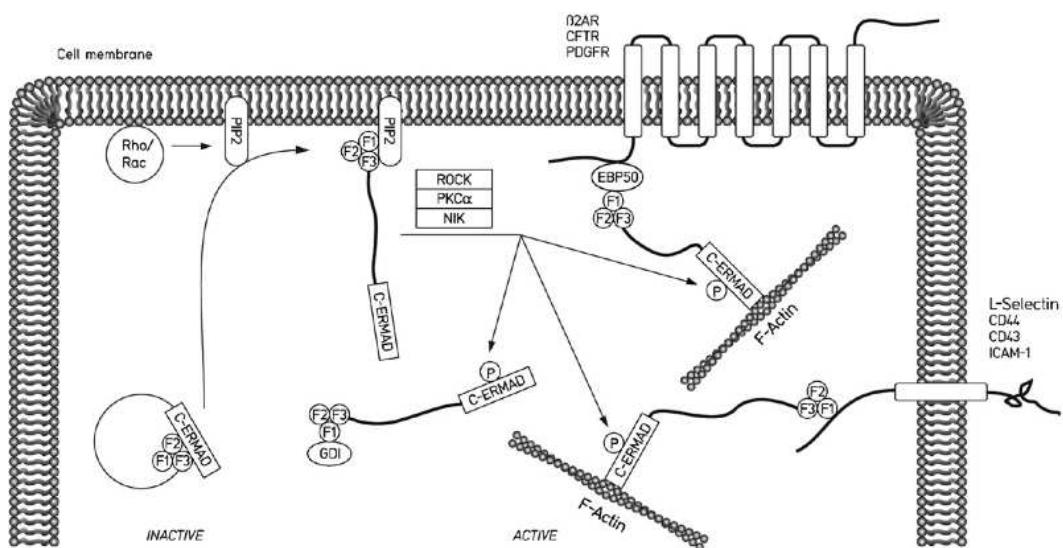


FIG. I.19: Principe d'activation des protéines ERM (extrait de [Niggli and Rossy, 2007]).

Les contributions respectives de ces différents partenaires à l'adhésion cytosquelette-membrane sont encore assez mal connues : des expériences d'extrusion de tubes membranaires par pinces optiques ont permis des mesures de l'énergies d'adhésion cytosquelette-membrane ([Raucher *et al.*, 2000], [Brochard-Wyart *et al.*, 2006]) ; il a été proposé que PIP₂ joue un rôle important dans cette énergie d'adhésion ([Raucher *et al.*, 2000]), cependant les PIPs sont également impliqués dans la signalisation de nombreux processus biochimiques (notamment la polymérisation d'actine corticale, [Janmey and Lindberg, 2004]), ce qui rend difficile de faire la part des choses entre leur contribution purement mécanique à l'énergie d'adhésion, et les effets indirects liés à la signalisation cellulaire. Par rapport à des liaisons fortes protéines-protéines, les liaisons via PIP₂ sont individuellement bien plus faibles, mais les estimations font état d'un nombre de liaisons via PIP₂ de l'ordre de quelques centaines à quelques milliers par μm^2 , ce qui correspondrait à une adhésion « continue » entre la membrane et le cortex via un grand nombre de liaisons faibles ([Sheetz, 2001], [Sheetz *et al.*,

2006]).

A l'instar de la section précédente où nous avions illustré les forces de polymérisation d'actine via l'exemple du lamellipode, nous allons à présent décrire l'exemple-type de protrusion dû à une pression hydrostatique : le « bleb ».

I.B.2.c Protrusion « modèle » par pression hydrostatique : le phénomène de « blebbing »

Un « bleb » est une protrusion membranaire, de forme approximativement hémisphérique ([Fackler and Grosse, 2008], [Charras and Paluch, 2008]) ; deux types principaux de blebs ont été décrits ([Keller *et al.*, 2002]), selon les détails de leur mécanisme de formation (voir figure I.20) :

- un premier type de blebs résultant de la rupture d'adhésion entre la membrane plasmique et le cortex d'actine.
- un second type de blebs formés après désassemblage du cortex d'actine.

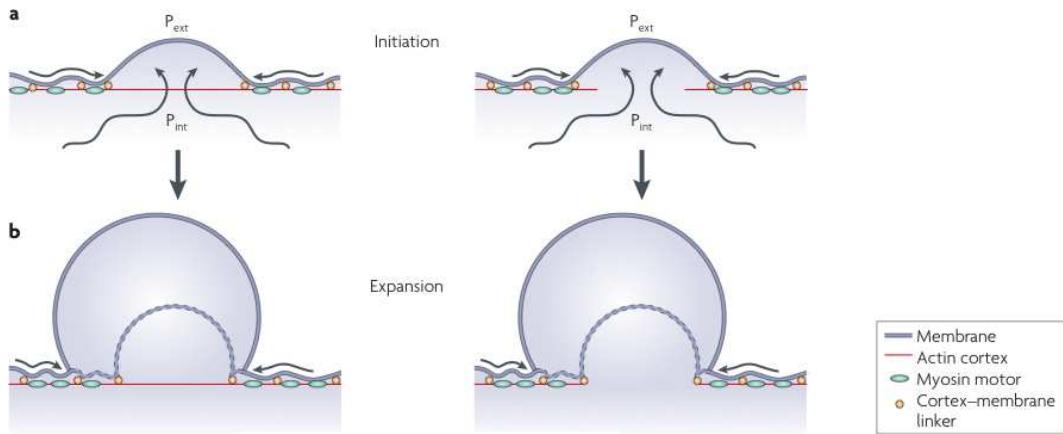


FIG. I.20: Les deux processus permettant de former un bleb : resp. par disjonction cytosquelette membrane et désassemblage du cortex (extrait de [Charras and Paluch, 2008]).

Dans les deux cas, une pression hydrostatique dans le cytoplasme entraîne l'expansion de la membrane par un flux de cytoplasme ; l'absence temporaire d'actine corticale dans le bleb au début de son développement est une signature caractéristique de l'absence de rôle dévolu aux forces de polymérisation d'actine dans le développement de cette protrusion. Le cycle complet de vie de la protrusion est décrit figure I.21 : un nouveau cortex d'actine est rapidement repolymérisé, probablement via des mécanismes similaires à la polymérisation lors du renouvellement de l'actine corticale ([Charras *et al.*, 2006] pointe un rôle probable des formines). Le bleb devient alors partie intégrante du cortex dans le cas d'un blebbing utilisé pour une motilité effective ([Keller and Eggli, 1998], [Blaser *et al.*, 2006], [Yoshida and Soldati, 2006]), est rétracté dans le cas d'un blebbing cyclique sans lien avec la motilité ([Cunningham, 1995]) ou non rétracté dans certains cas pathologiques ou en phase finale d'apoptose.

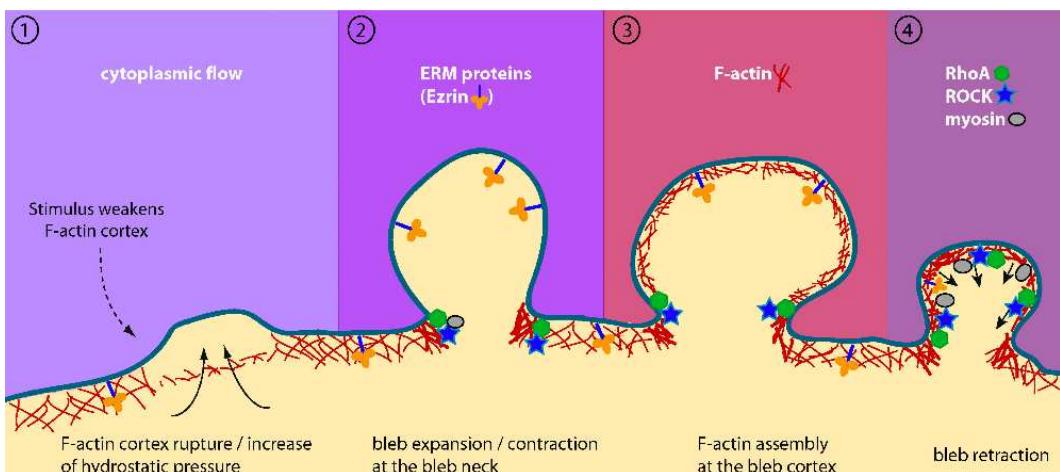


FIG. I.21: Cycle de vie du bleb (extrait de [Fackler and Grosse, 2008]).

Les blebs sont des structures transitoires et ont donc préférentiellement été étudiés dans des lignées cellulaires montrant une aptitude particulière à générer ces structures de façon régulière, notamment les systèmes suivants, auxquels nous allons consacrer quelques lignes dans la suite de cette section :

- une lignée de carcinosarcomes dite « Walker » ([Keller and Eggli, 1998]), non motiles en conditions standard puisque ce sont des cellules flottant dans leur milieu de culture.
- des lignées cellulaires de mélanomes déficients en ABP-280³, qui présentent un blebbing de surface persistant mais qui n'est pas utilisé par la cellule pour se déplacer ([Cunningham, 1995]).
- un blebbing induit par inhibition d'adhésion et dépolymérisation des microtubules ([Paluch *et al.*, 2005]).
- le blebbing est également une caractéristique de l'apoptose.

Des événements de blebbing en lien avec la motilité ont également été reportés dans d'autres systèmes cellulaires :

- selon [Yoshida and Soldati, 2006], une fraction des protrusions de *Dicystostelium* sont des blebs, en contradiction apparente avec d'autres études qui n'ont indiqué qu'un blebbing transitoire en réponse à un changement des conditions environnementales ([Langridge and Kay, 2006]) ou ont montré que le seuil de contractilité nécessaire à une disjonction n'était pas atteint (Merkel *et al.* [2000]).
- [Blaser *et al.*, 2006] a montré que la migration des cellules germinales primordiales au cours du développement du *Zebrafish* reposait sur des protrusions de type bleb.

A l'examen de ces modèles cellulaires, on remarque donc qu'ils n'apportent qu'assez peu de support expérimental pour l'étude d'une motilité supportée par

³ABP-280 (filamine) est, dans ces cellules, une des principales protéines impliquées dans gélation de l'actine : elle lie entre eux des filaments d'actine approximativement à angle droit.

pression hydrostatique en conditions physiologiques, hormis les observations de [Blaser *et al.*, 2006] et [Yoshida and Soldati, 2006], qui n'étaient pas publiés en 2005, au début de cette thèse. D'où notre choix d'*Entamoeba histolytica* en 2005 pour support de cette thèse, ce que nous justifierons plus en détails en fin d'introduction (section I.C.1).

Carcinosarcomes « Walker » Les carcinosarcomes « Walker » sont des cellules non adhérentes, qui peuvent se polariser spontanément et forment alors des blebs sur leur partie frontale ; lorsqu'on confine ces cellules entre deux lamelles de verre, les protrusions peuvent être converties (probablement par des processus de friction) en une migration effective.

Les blebs se forment aux endroits où l'actine corticale est localement dépolymérisée et/ou par détachement de la membrane plasmique d'un cortex plus ou moins intact ([Keller and Eggli, 1998]). Cette dissociation entre membrane et cytosquelette, qui est stimulée par la dépolymérisation des microtubules, est due essentiellement à une progression de la membrane plasmique, plutôt qu'à une rétraction du cortex d'actine. La couche corticale détachée de la protrusion nouvellement formée agit alors comme une frontière, limitant l'arrivée d'organelles dans la protrusion, mais elle dépolymérise ensuite tandis qu'un cortex se reforme sur la membrane de la protrusion, ceci pouvant donner lieu à un nouveau cycle de progression. La motilité est dépendante de la contractilité fournie par la myosine II ([Gutjahr *et al.*, 2005]).

[Schutz and Keller, 1998] utilise une micropipette afin de soumettre les cellules à des surpressions positives ou négatives ; pour des carcinosarcomes « Walker » initialement polarisés, il est plus facile de former des blebs par application d'une dépression sur l'avant de la cellule que sur l'arrière : l'adhésion cytosquelette-membrane est donc plus faible à l'avant de la cellule qu'à l'arrière, ce qui est un élément d'explication de la polarisation du blebbing. [Rossy *et al.*, 2007] montre que les protéines ERM se localisent préférentiellement à l'arrière des cellules polarisées, ce qui pourrait être la cause de cette asymétrie d'énergie d'adhésion cytosquelette-membrane.

Mélanomes déficients en filamine Ces mélanomes déficients en filamine (dite aussi ABP-280) sont des cellules, qui au cours du processus d'adhésion sur un substrat génèrent des blebs à leur surface ; le processus d'expansion d'un bleb dure quelques secondes (4 à 7 secondes, typiquement) et s'effectue sans à-coups ; souvent un autre bleb peut apparaître dans le prolongement du premier, l'ensemble est stable durant 10 à 20 secondes, puis est lentement rétracté en 40 à 60 secondes ([Cunningham, 1995]).

La force d'expansion est un flux cytoplasmique interne : en effet l'actine corticale est absente au début de l'expansion des blebs (vu par [Cunningham, 1995] par microinjection de phalloïdine marquée, puis confirmé par [Charras *et al.*, 2005] en utilisant de l'actine-GFP), et le volume cellulaire est conservé ([Char-

ras *et al.*, 2005] effectue des mesures sur fragments cellulaires qui confirment que le développement des blebs est dû à un flux cytoplasmique interne - et non externe). [Cunningham, 1995] avait pointé le fait que les vitesses d'expansion étaient plus élevées que ce qui aurait été permis par la polymérisation d'actine seule ([Cunningham, 1995] indique un taux d'expansion jusqu'à 30 μm^3 par seconde, soit quelques microns par seconde en vitesse radiale), mais [Charras *et al.*, 2008] indique des valeurs d'expansion plus faibles, de l'ordre de quelques dizièmes de microns par seconde, ce qui est comparable à des vitesses de kératocytes.

La rétraction est due à la contraction du cortex d'actine qui réapparaît dans les blebs matures (marquage de l'actine corticale : [Cunningham, 1995], [Charras *et al.*, 2005]) et permet le recrutement de la myosine II ([Charras *et al.*, 2005], [Charras *et al.*, 2006]) : ainsi un traitement de ces cellules à la cytochalasine D (qui inhibe la polymérisation d'actine) n'empêche pas la formation de blebs pendant quelques temps, mais la cellule est ensuite incapable de les rétracter ([Cunningham, 1995]) ; et des traitements qui inhibent l'activité contractile des myosines inhibent la rétraction des blebs (traitements à la N-ethylmaleimide pour [Cunningham, 1995] et à la blebbistatine pour [Charras *et al.*, 2005]). L'étude de la séquence de recrutement des protéines du cortex au cours de la polymérisation du nouveau cortex ([Charras *et al.*, 2006]) montre que le premier partenaire recruté est l'ezrine, puis l'actine, puis les protéines de liaison à l'actine, et enfin la myosine. L'énergie d'adhésion cytosquelette-membrane semble directement piloter la fréquence de blebbing, puisque la microinjection d'ezrine constitutivement active entraîne un arrêt du blebbing ([Charras *et al.*, 2006]).

[Charras *et al.*, 2005] teste quel est l'impact local de différentes drogues : ainsi, une application locale de blebbistatine inhibe la formation de blebs dans la zone traitée, alors que sur le restant de la cellule, on observe toujours des blebs. Selon [Charras *et al.*, 2005], ceci indique donc que c'est la contraction locale de la myosine qui nuclée localement des blebs. Les auteurs considèrent alors qu'il y a deux explications possibles :

- soit que c'est la contraction qui nuclée localement des blebs, alors que la pression hydrostatique est constante dans la cellule.
- soit que la suppression causée par contraction n'agit qu'au niveau local, et donc que la pression ne s'équilibre pas globalement.

Or, l'application locale de drogues dépolymérisant l'actine (cytochalasine D et latrunculine B), dans un premier temps provoque une augmentation générale de la dimension des blebs, puis dans un second temps le blebbing cesse dans la zone traitée (les blebs existants n'étant plus rétractés) tandis que le blebbing continue dans les zones non traitées mais à une fréquence moindre. Les auteurs considèrent ainsi que leurs expériences s'accordent mieux avec la seconde hypothèse, et ils proposent une théorie décrivant le cytoplasme comme un milieu poroélastique, dans lequel la pression hydrostatique ne s'équilibre que sur des échelles de temps d'une dizaine de secondes et une échelle spatiale de 15 à 30 microns (à condition de considérer un réseau avec des pores de 10 à 20 na-

nomètres) ; ainsi, la contraction du cortex d'acto-myosine pourrait causer une augmentation locale de pression hydrostatique, laquelle donnerait lieu, dans une région où la membrane serait faiblement attachée au cytosquelette, à la formation d'un bleb.

Blebbing induit par la dépolymérisation des microtubules [Paluch *et al.*, 2005] montre que des fibroblastes L929 ou des lymphocytes KE37, placés dans des conditions où l'adhésion est inhibée (trypsinisation puis dépôt sur lamelle avec un traitement de surface PEG) et où les microtubules sont dépolymérisés (au nocodazole), présentent un blebbing périodique ; le mécanisme sous-jacent est une contraction du cortex qui entraîne, par brisure de symétrie, la rupture du cortex à un endroit de la périphérie cellulaire ; la membrane n'étant plus maintenue à cet endroit, un bleb peut se développer par flux cytoplasmique. Un nouveau cortex se reforme dans le bleb, donnant lieu à un comportement de blebbing cyclique (la période des protrusions est de l'ordre de 300 secondes pour des cellules entières, et autour de 30 à 40 secondes pour des fragments cellulaires d'une dizaine de microns de diamètre).

Le blebbing au cours de l'apoptose L'apoptose est marquée par plusieurs changements caractéristiques : condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN, perte d'adhésion de la cellule et arrondissement, et blebbing dynamique à la membrane ; il est possible d'isoler le phénomène de blebbing au cours de l'apoptose de la manière suivante : en retirant le sérum du milieu de culture, on déclenche l'entrée en apoptose ; ensuite, par l'utilisation d'un inhibiteur de caspase, il est possible d'obtenir une population cellulaire « bloquées » dans une phase précoce de l'apoptose où le blebbing est la seule manifestation de cette phase pré-apoptotique. En utilisant ce modèle, [Mills *et al.*, 1998] propose que la contraction du réseau d'actine corticale soit relaxée par le clivage de protéines de liaison actine-membrane (ABP ou fodrine) : ainsi la calpaïne semble un bon candidat pour le clivage de la jonction cytosquelette-membrane. [Mills *et al.*, 1998] a pu montrer que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine II (ce qui permet à la myosine II de lier l'actine) augmentait le blebbing (à contrario, des inhibiteurs de MLCK - myosin light chain kinase - diminuent le blebbing en réduisant la phosphorylation de la MLC - myosin light chain) ; les protéines Rho sont également impliquées dans le blebbing apoptotique, avec comme cible ROCK-I ; ROCK II jouerait également un rôle dans le blebbing apoptotique ([Sebbagh *et al.*, 2005]).

A contrario, d'autres études indiquent que le blebbing dépend de l'activation des caspases, mais pas de Rho (voir [Leverrier and Ridley, 2001]) : en l'occurrence, une fois les caspases activées, elles clivent certaines protéines, dont la kinase ROCK-I ([Sebbagh *et al.*, 2001]), produisant ainsi une forme constitutivement active (le clivage enlève le domaine inhibiteur de ROCK-I) : cette forme activée de ROCK-I permettrait alors la phosphorylation de la MLC, augmentant la contractilité corticale.

Toujours est-il que le modèle proposé pour expliquer ce blebbing apop-totique (voir notamment [Mills *et al.*, 1999], et [Mills *et al.*, 1998] est une contraction du cortex d'actine, causant une contraction de la membrane, sauf aux endroits où le cortex est faiblement attaché à la membrane (par exemple en raison d'une activité protéolytique à l'encontre des protéines de jonction) et où la membrane forme donc des blebs.

I.B.3 Adhésion à l'environnement

I.B.3.a Les molécules de l'adhésion cellulaire

Les protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire comportent de manière générale une partie intracellulaire qui interagit avec les éléments du cytosquelette et une partie extracellulaire permettant l'adhésion avec l'extérieur. On compte un certain nombre de molécules d'adhésion, impliquées dans l'adhésion :

- au substrat,
- à d'autres cellules de même type,
- à des cellules de type différent.

Adhésion non spécifique L'adhésion non spécifique d'une membrane lipide sur un substrat correspond à des interactions liées à des forces fondamentales, notamment les forces de van der Waals. Cette adhésion non spécifique peut être décrite par un potentiel d'adhésion représentant le gain d'énergie libre par unité d'aire en contact, avec des valeurs pouvant aller de 10^{-4} mJ/m² à 1 mJ/m² selon la littérature ([Tordeux *et al.*, 2002]). La description de l'adhésion sous forme d'un potentiel fait qu'il n'y a pas contact strict mais une distance d'équilibre allant de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres selon la valeur de l'énergie d'interaction ([Tordeux *et al.*, 2002]).

Intégrines Les intégrines sont des glycoprotéines qui agissent comme récepteurs de différentes protéines de la matrice extracellulaire ou de ligands situés à la surface d'autres cellules. Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . On distingue 18 sous-unités α et 8 sous-unités β dont l'association forme une vingtaine d'intégrines. Leur capacité à se lier spécifiquement à un ligand dépend de la combinaison de ces différentes sous-unités. Elles peuvent, par exemple, interagir avec des membres des autres familles de molécules de l'adhésion cellulaire, comme les cadhérines. Plus généralement, une même intégrine est capable de se lier à plusieurs ligands, comme par exemple la fibronectine, la laminine ou la vitronectine, présentes dans la matrice extracellulaire ; ces protéines multidomaines s'adsorbent sur les surfaces de verre ou de plastique, et présentent des séquences spécifiques qui sont reconnues par les récepteurs de la surface cellulaire (particulièrement

une courte séquence Arg-Gly-Asp que l'on retrouve à la fois dans les domaines protéiques de la fibronectine et de la vitronectine dédiés à l'interaction avec la cellule).

Les intégrines peuvent être impliquées dans des complexes protéiques plus larges, les contacts focaux (figure I.22), à la fois impliqués dans la liaison aux fibres de stress et servant de voie de transduction aux signaux entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

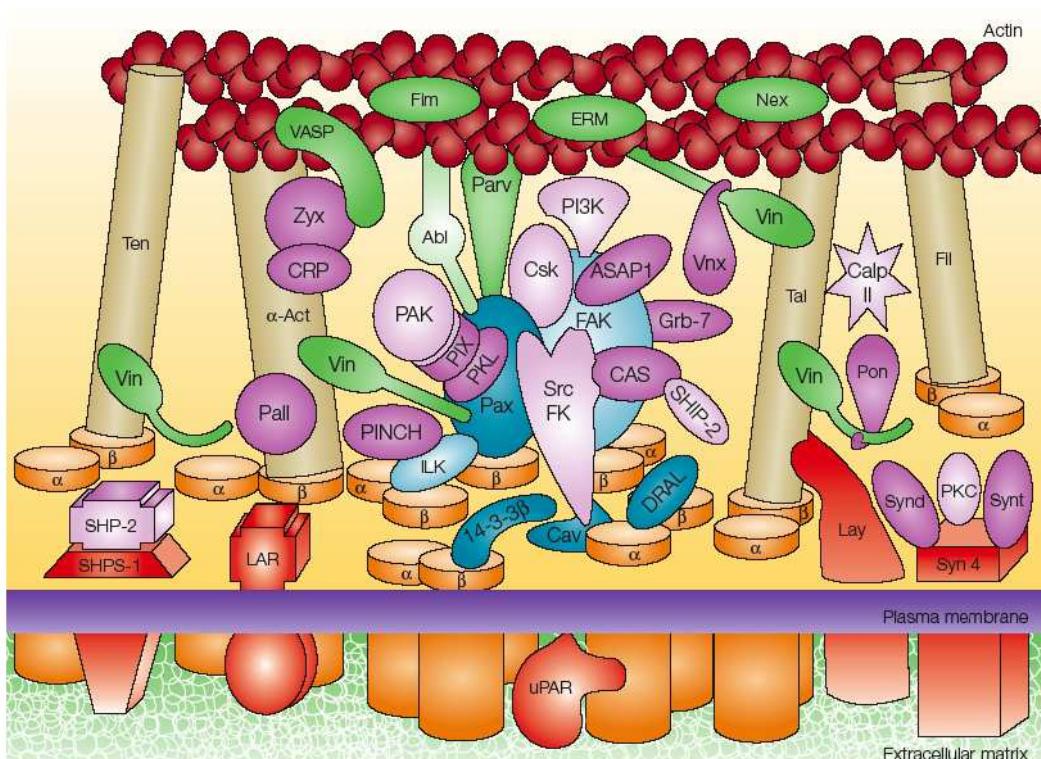


FIG. I.22: Complexité moléculaire d'un contact focal (d'après [Geiger *et al.*, 2001]).

Lectines Les lectines sont des protéines comportant des épitopes spécifiques pour la reconnaissance des glycoprotéines de la surface cellulaire. Plusieurs fonctions leur ont été attribuées, que ce soit une reconnaissance spécifique entre cellules, ou plus simplement une régulation de l'adhésion entre cellules. Parmi les différentes familles de lectines, citons les lectines de type C qui sont des protéines membranaires, ou les galectines qui sont des protéines solubles (figure I.23, [Taylor and Drickamer, 2007]).

Cadhéries Les cadhérines sont essentiellement présentes dans les jonctions cellulaires, qui sont des régions spécialisées permettant le contact cellule-cellule ([de Beco *et al.*, 2009]). Elles peuvent se lier au cytosquelette via un complexe

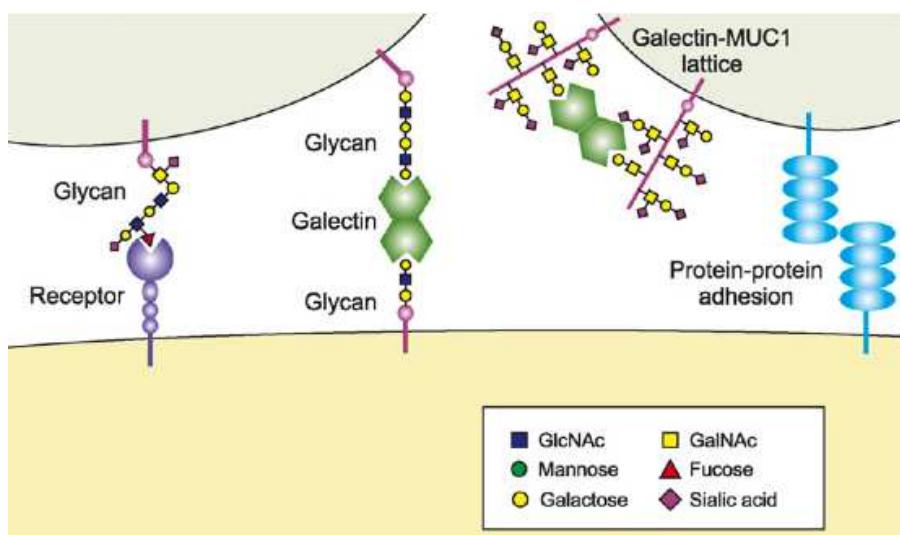


FIG. I.23: Modes d'interaction des lectines (d'après [Taylor and Drickamer, 2007]).

multi-protéique impliquant les caténines. L'adhésion des cadhérines est homotypique⁴ et dépend de la présence de calcium.

I.B.3.b Dépendance des mécanismes protrusifs vis à vis du substrat

La motilité cellulaire utilise le substrat à la fois pour servir de support aux protrusions nouvellement formées, et pour servir d'ancrage afin de permettre la rétraction d'autres régions.

Pour des cellules capables d'adhérer fortement au substrat, pouvant même conduire à des protrusions telles des lamellipodes dont la forme épouse rigoureusement le substrat, il y a un couplage étroit entre l'adhésion et le mécanisme de protrusion, de sorte que les différences entre observations *in vitro* (cellules sur un substrat 2D rigide en verre) et *in vivo* (cellules dans un environnement 3D mou) sont importantes ([Cukierman *et al.*, 2001]) ; d'ailleurs la motilité peut même être guidée par les propriétés mécaniques du substrat (durotaxie : [Lo *et al.*, 2000]).

Mais pour d'autres cellules motiles, en particulier les amibes, l'adhésion au support est réduite et le substrat est donc plus permissif quant à la morphologie cellulaire. D'ailleurs, les mécanismes de protrusions peuvent très bien être observés même en l'absence de support : ainsi des neutrophiles non adhérents, placés dans des conditions de culture appropriées ([Keller and Cottier, 1981]), montrent des mouvements protrusifs tout à fait analogues à ceux de neutrophiles motiles adhérents sur un support ; il en est de même pour les carcinosarcomes « Walker » pour lesquels l'adhérence au support n'est pas né-

⁴Une molécule se lie avec une molécule du même type, i.e. ici une cadhérine se lie à une cadhérine de la cellule voisine.

cessaire à la mise en place de la machinerie de locomotion, seule est nécessaire pour ce type cellulaire la polarisation de la cellule, qui peut être réalisée pour des cellules non adhérentes ([von Tscharner Biino *et al.*, 1997]). Ce type d'observations suggère donc que les mouvements protruſifs peuvent être au moins partiellement découpés des processus d'adhésion ; bien entendu le support est nécessaire pour que les mouvements protruſifs puissent permettre l'avancée effective de la cellule, mais, pour certains types cellulaires, la présence du support n'est pas indispensable pour que les protrusions elles-mêmes puissent se développer.

La vitesse effective de migration est elle-même dépendante de l'énergie d'adhésion au substrat ([Friedl *et al.*, 2001]) : si l'adhésion est trop faible pour permettre un transfert effectif de moment, la migration ne sera pas efficace ; à l'inverse, si l'adhésion est trop forte, la cellule sera incapable de faire une rétraction efficace.

I.C *Entamoeba histolytica*, un modèle de migration amiboïde

I.C.1 Motivations de l'étude

Ce projet a pour but la compréhension des mécanismes de la motilité cellulaire dite amiboïde ; impliquée notamment dans les processus métastatiques. Il est très peu probable qu'on trouve, dans le cas des cancers, des mécanismes spécifiques pour assurer la motilité cellulaire, car la règle est l'opportunisme. De ce point de vue, il nous semble important d'étudier différents type de motilité, de comprendre en quoi ces solutions sont avantageuses, et quels sont les paramètres physiques et biochimiques clés conduisant à tel ou tel type de mouvements. C'est pour cette raison que notre équipe s'intéresse depuis quelques années à l'étude des mouvements cellulaires, à la fois dans le système immunitaire (collaboration S. Amigorena, Institut Curie), et dans le modèle infectieux (collaboration N. Guillen, Institut Pasteur). Force est de constater des ressemblances fortes entre les mouvements de lymphocytes et de cellules dendritiques au cours de la réponse antitumorale ([Hugues *et al.*, 2004]), et ceux d'amibes *in vivo* lors de la colonisation du tissu hépatique par exemple ([Coudrier *et al.*, 2005]). Dans les deux cas, nous observons des mouvement non dirigés, effectués probablement en absence de signaux chimiotactiques, et guidés tout au plus par des informations de contact. Les mouvements amiboïdes, définis par l'activité de déformation de la membrane, avec émission de protrusions plutôt rondes ressemblant à des blebs, semblent en effet être la base des déplacements non-guidés des cellules hématopoïétiques comme des amibes ([Friedl and Wolf, 2003]).

Nous avons choisi de nous intéresser ici à l'amibe parasite *Entamoeba histo-*

lytica, responsable des amibiases. La motilité de cette cellule procède de deux grandes phases distinctes : exploration aléatoire de l'espace, et motilité dirigée ; ce second mécanisme a son importance à divers stades du processus invasif, tandis que le premier joue un rôle dans l'invasion des tissus en l'absence de gradient chemoattractant. Durant la chemotaxie, l'activité protrusive « aléatoire » est réprimée via la formation d'un unique pseudopode frontal ([Blazquez *et al.*, 2006], [Zaki *et al.*, 2006]) ; ceci est concordant avec nos observations *in vivo* de la motilité d'*E. histolytica* dans des tissus du foie ([Coudrier *et al.*, 2005]). A la différence de la chemotaxie et des mouvements dirigés amibiens largement étudiés chez *Dictyostelium*, la motilité « aléatoire » semble jouer ici un rôle-clé pour permettre la dissémination des cellules, de façon analogue aux métastases cancéreuses.

Le projet de la thèse s'intéresse plus spécifiquement aux mécanismes de motilité « aléatoire », les aspects liés à la motilité dirigée étant eux étudiés plus en détails par nos collaborateurs de l'Institut Pasteur (équipe de Nancy Guillen) : la mise en commun des compétences vise à terme à une compréhension générale du mécanisme de motilité. Notre intuition est que les deux comportements motiles sont étroitement liés et qu'il sera possible, à terme, d'envisager les motilités dirigées et aléatoires via un unique cadre conceptuel, donnant les moyens de comprendre comment la machinerie de signalisation permet de placer la cellule dans un type de motilité donné en influençant les paramètres physiques de la cellule.

I.C.2 Biologie d'*E. histolytica*

Entamoeba histolytica est une amibe parasite qui infecte l'intestin. L'infection est asymptomatique dans une majorité de cas, mais pour environ 10 % des individus il y aura développement d'une amibiase⁵, touchant 50 millions de personnes par an et entraînant 100 000 décès annuels ([Stanley, 2003]). Les amibiases affectent principalement les populations pauvres des pays en développement qui doivent se contenter de conditions d'hygiène précaires.

E. histolytica existe sous deux formes : une forme motile (fig. I.24) et une forme kystique de résistance⁶. L'infection débute par l'ingestion d'*E. histolytica* sous sa forme kystique par le biais d'aliments ou d'eau contaminés ; puis les kystes donnent naissance à des parasites motiles au niveau de l'intestin. Ces parasites motiles peuvent prendre deux aspects différents : une forme non-hématophage inoffensive, petite, localisée exclusivement dans la lumière de l'intestin où elle se nourrit de débris cellulaires, et une forme hématophage, plus grande que la première ; c'est cette seconde forme qui pénètre dans la paroi intestinale et se répand ensuite via la veine porte dans le foie, où elle

⁵également appelée dysenterie amibienne.

⁶la transformation d'une forme en l'autre dépend notamment de l'environnement de la cellule, mais ces processus de transformation sont encore à ce jour largement incompris.

cause des abcès graves ([Stanley, 2001]).

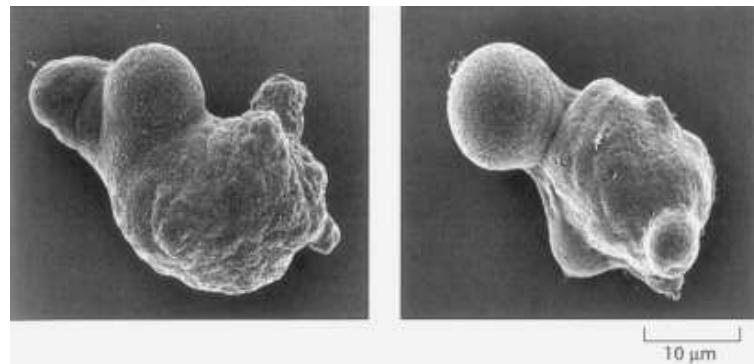


FIG. I.24: Micrographie électronique d'*Entamoeba histolytica*, d'après [Bray, 2001], due à A. Gonzales-Robles.

La motilité de la forme pathogène se caractérise par des changements morphologiques rapides, avec l'expansion de pseudopodes, ceci aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* ([Coudrier *et al.*, 2005] et fig. I.25) : ces protrusions s'accompagnent de flux cytoplasmiques qui entraînent les organelles internes dans la protrusion nouvellement formée ; ces changements morphologiques rapides permettent une exploration efficace de l'environnement local, les pseudopodes pouvant au choix être rétractés ou stabilisés ; la motilité est spontanée (il n'y a pas nécessité de l'induire par un quelconque composé externe lorsqu'on l'étudie *in vitro*) et durable, se produisant sans discontinuer durant des heures.

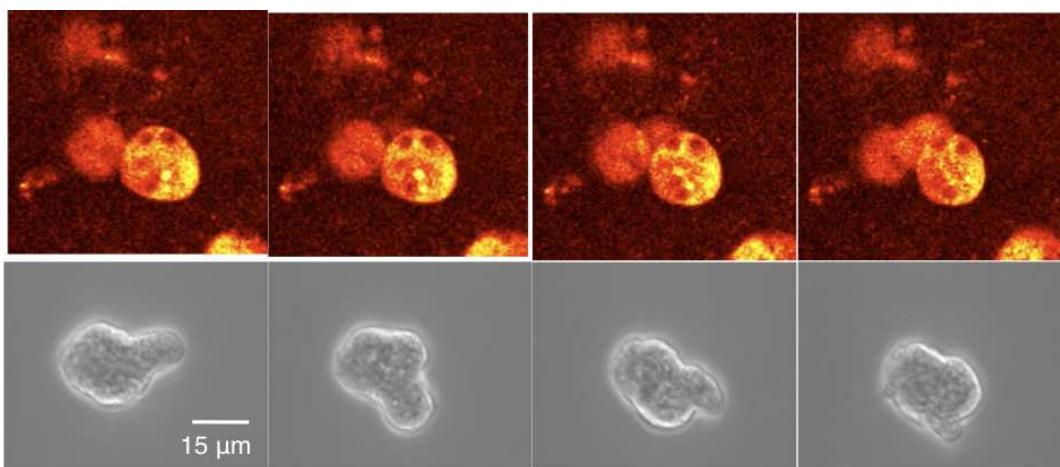


FIG. I.25: Motilité d'*E. histolytica*, *in vivo* (en haut) et *in vitro* (en bas) (resp. microscopie à 2 photons et microscopie à contraste de phase, intervalle temporel entre images : 7,5 secondes). Dans les deux cas on observe des protrusions « globulaires ».

La forme globale de la cellule n'est pas stationnaire : les protrusions qui se succèdent sont susceptibles d'apparaître dans des directions très diverses, de façon apparemment aléatoire sur tout le pourtour cellulaire (figure I.26).

Les protrusions en elles-mêmes sont globulaires (et en effet, à 3 dimensions, les images de microscopie électronique à balayage donnent l'image de protrusions sphériques, voir figure I.24).

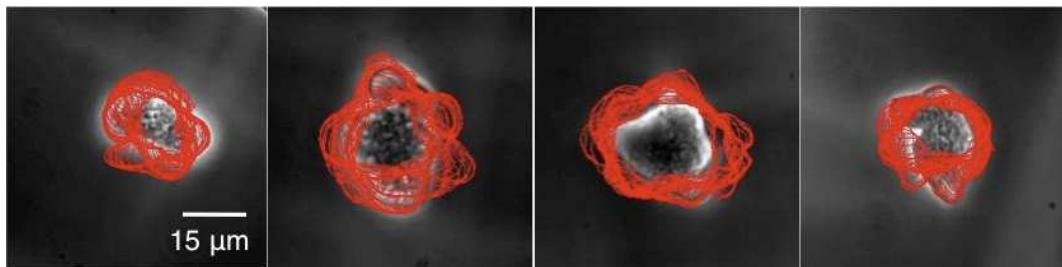


FIG. I.26: Différents exemples de cellules *E. histolytica* en conditions usuelles de motilité. Les contours sont détectés au rythme de 1 par seconde, puis superposés après recentrage sur la première image (durée totale : 30 secondes). On observe de fortes variations de la forme cellulaire, avec des protrusions qui remodèlent continuellement la morphologie, à la différence par exemple de la motilité d'un kératocyte se mouvant avec une forme stationnaire.

Ainsi, en l'absence de signal externe, les protrusions successives ne montrent pas de corrélation notable en ce qui concerne leur direction, ce qui conduit à une exploration de l'espace similaire à celle permise par une marche aléatoire. *A contrario*, si un gradient de chemoattractant est présent, l'occurrence et la stabilisation des protrusions auront lieu de préférence dans la direction de ce gradient ([Blazquez *et al.*, 2006]), résultant en un mouvement dirigé.

Le génome d'*E. histolytica* a été séquencé récemment ([Loftus *et al.*, 2005]), mais la compréhension précise de l'organisation de son cytosquelette n'en est encore qu'à ses débuts ([Guillen-Aghion, 2006]) : les données génétiques confirment la présence de gènes codant pour l'actine et les microtubules, alors que des gènes pour les filaments intermédiaires n'ont pas été identifiés à ce jour. Parmi les gènes codant pour l'actine, certains sont des hybrides aux caractéristiques encore inconnues. Un grand nombre de protéines, potentiellement homologues de protéines de liaison à l'actine, sont présentes dans le génome ; il n'y a pas d'homologues de WASP, mais on trouve plusieurs formines. On trouve encore des protéines permettant de lier des brins d'actine entre eux, comme la filamine. Par rapport à d'autres protozoaires, il semble que chez *E. histolytica* le réseau protéique en lien avec l'actine soit plus développé, au détriment des protéines ayant rapport aux microtubules. Les trois sortes de microtubules présents chez *E. histolytica* (α , β et γ) sont « intranucléaires », on n'observe pas de microtubules cytoplasmiques chez cet organisme. Parmi les myosines, on trouve la « conventionnelle » myosine II, et une seule autre myosine non-conventionnelle, une myosine IB.

Il a été démontré que la myosine II jouait un rôle essentiel dans la motilité d'*E. histolytica*, à la fois *in vitro* ([Arhets *et al.*, 1998]) et *in vivo* ([Coudrier *et al.*, 2005]), mais la nature exacte du mécanisme de motilité chez *E. histolytica*

n'était pas connue avant ce travail de thèse.

I.C.3 Problématique et questions posées

Nous venons d'évoquer dans leurs grandes lignes les caractéristiques de la motilité d'*E. histolytica* (section I.C.2). Dans l'étude préalable à cette thèse ([Coudrier *et al.*, 2005]), la résolution et la cadence d'acquisition en imagerie étaient insuffisantes pour élucider les mécanismes détaillés du mouvement. Ce travail vise à déterminer quelles sont les mécanismes permettant la motilité d'*E. histolytica*, et quels sont les paramètres de contrôle physiques et biochimiques de la formation des protrusions.

Nous tâcherons donc de répondre aux questions suivantes :

- quelle est l'origine physique de la force permettant de créer et développer les protrusions ?
- quels sont les paramètres permettant de contrôler la motilité ?
- comment s'opère le couplage entre développement des protrusions et adhésion au substrat, pour permettre une motilité effective ?

Le chapitre II présentera les résultats préliminaires obtenus qui nous ont permis de mettre en place un modèle explicatif de la motilité d'*E. histolytica* ; le chapitre III sera consacré aux test expérimentaux des paramètres de contrôle du modèle, de façon qualitative et dans la mesure du possible quantitative.

Chapitre II

Vers un modèle de la motilité cellulaire d'*Entamoeba histolytica*

Après une brève description du dispositif expérimental principal (section II.A), ce chapitre abordera les points suivants :

- comment la cellule utilise-t-elle le substrat pour se mouvoir ? (section II.B)
- que nous apprend l'analyse du mouvement global des cellules ? (section II.C)
- que nous apprend une analyse de protrusions individuelles ? (contraste, morphologie, cinétique) (section II.D)
- quelle est la dynamique du cytosquelette d'actine au cours de l'expansion d'une protrusion ? (section II.E)

Nous conclurons ce chapitre par une section décrivant un modèle permettant de rendre compte de ces observations (section II.F).

II.A Dispositif expérimental

Le niveau d'activité motile entre différentes cellules d'une même population présente, intrinsèquement, une certaine hétérogénéité (ne serait-ce que parce que les cellules sont à des stades différents de leur cycle cellulaire) ; ceci complique l'analyse de la réponse à un changement environnemental (drogue, effet osmotique...), puisqu'il faut multiplier le nombre de cellules suivies afin de déterminer une moyenne des comportements. Une alternative à la comparaison entre populations entières est de suivre des cellules individuelles au fil des changements de conditions¹. Dans le cas d'*E. histolytica*, nous sommes

¹par enregistrement de la cellule en conditions normales, puis par un nouvel enregistrement après avoir changé le milieu environnant ; on peut même remettre du milieu standard dans un 3ème temps pour voir si l'effet est réversible ou non.

face à plusieurs difficultés spécifiques qui ont nécessité la mise au point d'un protocole adapté :

- *E. histolytica* requiert un environnement appauvri en oxygène ; typiquement, si une phase gazeuse est en contact avec le milieu de culture de l'amibe, sa teneur en oxygène doit être réduite à 3-5 % au plus ([Band and Cirrito, 1979], [Cedeno and Krogstad, 1983]). Pour ce faire, nous avons systématiquement « bullé » à l'azote toute solution appliquée aux amibes durant plusieurs dizaines de minutes ; de plus nous avons utilisé un dispositif expérimental quasi-hermétique (cf. figure II.1.a et b) : la chambre est remplie à ras bord puis fermée par le hublot, ce qui entraîne un effet « ventouse », lequel permet une isolation suffisante pour observer une motilité cellulaire normale durant plusieurs heures.
- une autre difficulté est la faible adhésion des cellules au substrat, qui entraîne quasi-systématiquement un déplacement des cellules lors d'un changement de bain. Pour pallier à ce problème, nous avons utilisé une grille métallique soutenue sur des billes de quelques centaines de microns (voir figure II.1.c), ce qui protège les cellules des effets convectifs lors des changements de bain. Le volume protégé est faible devant la contenance totale de la chambre, ce qui permet une homogénéisation rapide par simple diffusion². De plus le volume protégé est suffisamment faible par rapport au volume remplacé ($400 \mu\text{m}$ pour une hauteur de chambre totale de 7 mm, soit moins de 6 %) pour qu'il n'y ait pas nécessité de nombreux bains avant d'atteindre une concentration maximale élevée.

Notons également que pour pouvoir suivre une cellule avant et après changement de bain, il faut adapter la densité cellulaire afin qu'elle ne soit pas trop forte ; typiquement les cellules doivent être espacées d'une distance supérieure à leur déplacement moyen durant le temps pris par le changement de bain, autrement le suivi des cellules sera ambigu.

II.B Quel est le rôle du substrat ?

II.B.1 Le substrat est-il nécessaire à la mécanique de génération des protrusions ?

Nous avons déjà évoqué à la section I.B.3.b le fait que selon le type de motilité mis en oeuvre par la cellule, la dépendance aux propriétés géométriques et mécaniques du substrat peut-être importante ou secondaire ; pour ce qui

²Par un calcul simplifié utilisant la loi de diffusion à 3 dimensions $r^2 = 6Dt$, on peut dire que le temps requis pour que le front de progression ait avancé de r est $\frac{r^2}{6D}$. Donc si h est la hauteur du volume protégé, l'homogénéisation est effective au bout d'un temps $\tau = \frac{h^2}{6D}$. Par exemple pour le sucre, $D = 520 \mu\text{m}^2 / \text{sec}$; pour notre dispositif $h = 400 \mu\text{m}$, d'où $\tau \simeq 50 \text{ sec}$, ce qui est de l'ordre du temps requis pour les manipulations entre le changement de bain et la reprise des observations.

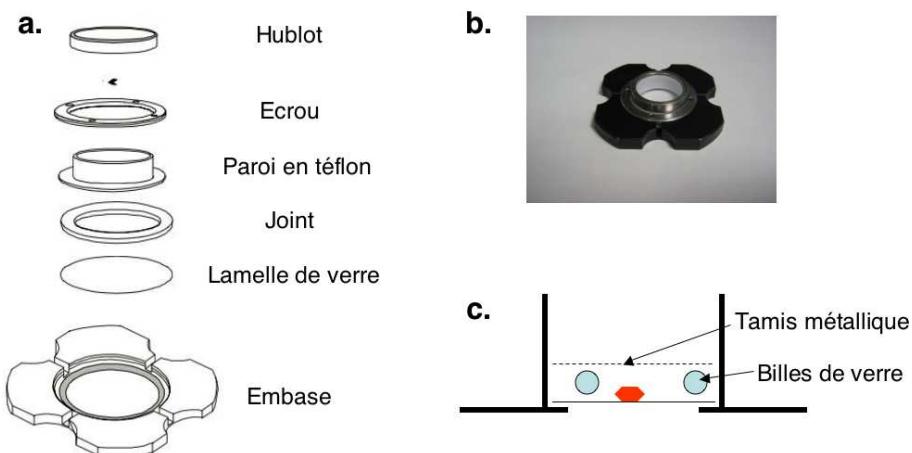


FIG. II.1: a) Schéma de la chambre d'observation utilisée pour les observations en microscopie. b) Photo de la chambre. c) Schéma du dispositif avec grille métallique et billes de soutien permettant de définir un compartiment protégé lors des changements de bain.

concerne *E. histolytica*, les protrusions sont extrêmement similaires *in vivo* et *in vitro*, avec une dynamique rapide et une forme globulaire (figure I.25), de sorte que les mécanismes qui génèrent les protrusions ne semblent pas dépendre de façon notable des caractéristiques mécaniques précises du substrat³.

Nous avons procédé à une expérience simple qui nous a convaincu que la rigidité et la géométrie du substrat n'étaient pas essentiels dans le processus de formation des protrusions d'*E. histolytica* : nous avons placé des cellules en suspension à l'interface entre deux milieux liquides de densité différente, et nous avons alors observé qu'elles continuent à montrer une activité protrusive (figure II.2) ; bien évidemment, en l'absence de substrat (et donc par impossibilité de friction sur une surface solide et/ou d'adhésion), ces déformations ne peuvent être converties efficacement en mouvement global de l'ensemble de la cellule : les cellules « en suspension » montrent essentiellement des déplacements résiduels dus à des fluctuations thermiques, similaires à ceux de particules interties « browniennes ».

De façon similaire, des cellules détachées transitoirement de leur substrat continuent à étendre des protrusions, converties en déplacements effectifs dès qu'elles atteignent un substrat, sur lequel elles sont immédiatement capables d'appliquer des forces (d'adhésion et/ou de friction) (figure II.3).

Ainsi, la rigidité et la géométrie du substrat n'influencent pas fortement le processus de génération des protrusions par lui-même, et nous pensons donc qu'étudier la façon dont ces cellules se comportent dans des conditions physiologiques, quel que soit le substrat (par ex. sur un substrat en verre), nous

³le module d'Young du verre est typiquement de l'ordre de dizaines de GPa, tandis que le module d'Young de tissus mous *in vivo* est plutôt est kPa.

⁴Sigma Aldrich, densité 1.130 ± 0.005 g/ml.

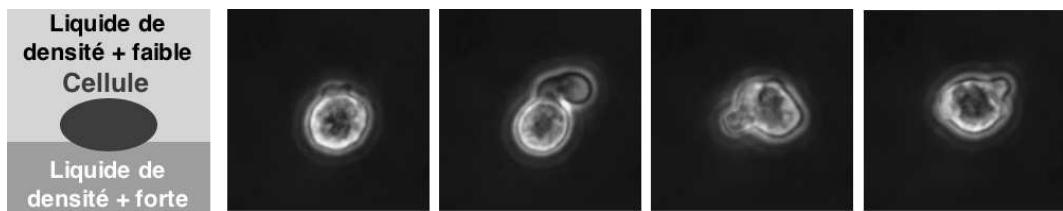


FIG. II.2: Cellule en suspension sur du milieu Percoll⁴. Malgré l'absence de substrat, *E. histolytica* étend continuellement de nouvelles protrusions ; mais au vu de l'impossibilité de transmettre des forces via un substrat de référence, l'extension des protrusions n'a pas d'effet net sur son déplacement (intervalle temporel entre images : 10 secondes).

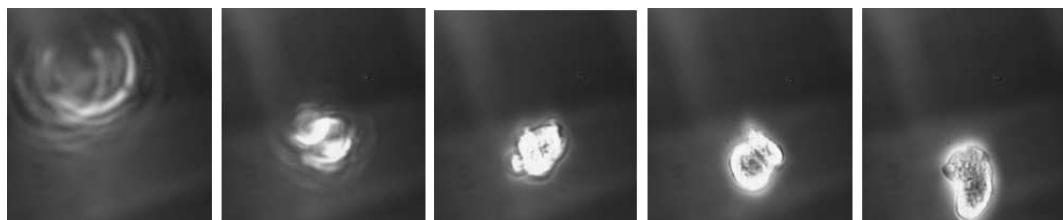


FIG. II.3: Sédimentation d'une cellule, qui se poursuit par adhésion au substrat et motilité. Sur l'image 1 et 2, la cellule n'a pas encore atteint le substrat et apparaît donc hors focus ; sa forme évolue dynamiquement ce qui indique que des protrusions sont déjà à l'oeuvre. La cellule atteint le substrat entre les images 2 et 3. Immédiatement (images 4 et 5), les protrusions qui se poursuivent peuvent être converties en mouvement effectif, sans qu'il y ait besoin d'une phase particulière d'adhésion (longue) au substrat comme on peut l'observer sur d'autres types cellulaires (intervalle temporel entre images : 10 secondes).

permet de capturer les éléments-clés pour comprendre le mécanisme de formation des protrusions, dans des conditions bien plus favorables pour l'imagerie, l'application de drogues et l'utilisation de divers outils biophysiques que ce qui serait permis dans des conditions strictement *in vivo*.

Le fait que l'extension de protrusions soit possible même en l'absence de substrat est également une indication forte que le processus de motilité ne peut être réduit ici au modèle canonique du lamellipode (décrit en introduction section I.B.1.c).

II.B.2 Effets de variation des propriétés du substrat

En règle générale, faire varier les propriétés d'adhésion du substrat a un impact important sur la morphologie et la migrations de cellules ([Thery *et al.*, 2006]) ; pour *E. histolytica*, les adhésions développées lors de la motilité sur une surface en verre semblent beaucoup plus faibles que pour d'autres types cellulaires ; cependant, il est envisageable qu'en modulant l'adhésion, on

soit capable d'influencer le développement des protrusions, et donc l'efficacité et la directionnalité de la migration. Les paragraphes qui suivent présentent les résultats obtenus en jouant sur différentes sources d'adhésion cellulaire (hydrophobicité - II.B.2.a, interactions électrostatiques - II.B.2.b, interactions spécifiques - II.B.2.c).

II.B.2.a Variation des propriétés hydrophiles du substrat

Il est possible, par traitements chimiques (collaboration Vincent Semetey, Institut Curie), de rendre le substrat plus hydrophobe ou hydrophile que sa valeur par défaut. Ainsi, de base, le verre a une hydrophilie faible; il peut être rendu hydrophobe par un greffage de composés silanes⁵, voire très hydrophobe par un greffage de dérivés fluorés alcanes ; à l'inverse, par greffage de polyéthylène glycol (PEG), le substrat est rendu hydrophile. On joue ainsi sur les propriétés d'adhésion des cellules, tant sur l'adhésion non-spécifique, que l'adhésion spécifique par modification de l'affinité du substrat pour des molécules d'adhésion.

Une méthode basique pour comparer la motilité dans diverses conditions est de tracer le déplacement quadratique moyen des trajectoires :

$$MSD(\tau) = < (\overrightarrow{r(t + \tau)} - \overrightarrow{r(t)})^2 >$$

La figure II.4 montre les résultats obtenus par l'utilisation de traitements de surface hydrophobes : ces traitements n'ont pas permis de mettre en évidence une différence de comportement notable entre mouvement des cellules sur verre normal et sur verre traité. Notons qu'*a contrario*, [Coudrier *et al.*, 2005] avait montré que la motilité était affectée lorsque l'on affectait l'adhésion du côté de la cellule en ciblant la lectine Gal-GalNac (voir aussi la figure II.11).

De façon similaire, un traitement de surface hydrophile (PEG) ne conduit pas à une différence de comportement motile notable (voir figure II.5).

En conclusion, faire varier les propriétés d'hydrophobicité du substrat n'a pas d'impact notable sur la motilité des cellules. Les raisons probables sont :

- l'impact sur l'adhésion non spécifique (décrise section I.B.3.a) semble faible.
- il y a certainement un impact sur l'adsorption des protéines du milieu cellulaire, ces protéines pouvant ensuite servir d'ancre à des adhésions cellulaires ; mais vu l'absence d'effet il semble que les protéines du milieu

⁵protocole employé : les lamelles de verre ont été plongées dans un bain de H₂O₂ + H₂SO₄ (1/2) pendant une nuit puis rincées abondamment avec de l'eau déionisée et séchées à l'air comprimé. Elles ont été ensuite placées pendant 4 heures dans du dichlorométhane contenant 1% (v/v) d'un dérivé de type trichlorosilane (octadecyltrichlorosilane, Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydroctyltrichlorosilane) puis celles-ci sont rincées avec du dichlorométhane et de l'éthanol.

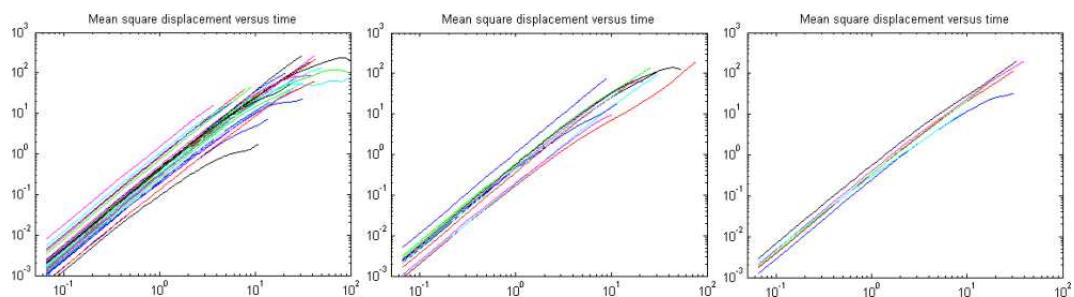


FIG. II.4: Comparatif entre diverses conditions de motilité cellulaire avec variation de l'hydrophobicité du substrat. Déplacement quadratique moyen de trajectoires cellulaires (abscisses en secondes, ordonnées en $\mu\text{m/sec}$), de gauche à droite : sur verre brut sans traitement ($N = 30$), sur verre traité silane C10 perfluoré ($N = 6$), sur verre traité alcane C18 ($N = 12$). La motilité est comparable entre les diverses conditions de traitement de surface.

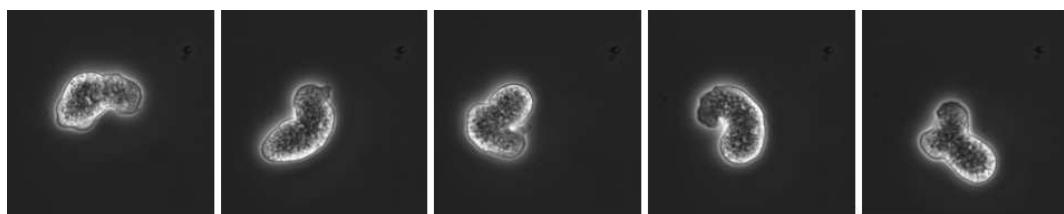


FIG. II.5: Mouvement d'une amibe sur substrat recouvert de PEG ; l'amibe étend normalement des protrusions, qui permettent un déplacement effectif de la cellule, de façon tout à fait similaire à ce qu'on observe sur un substrat standard (intervalle temporel entre images : 10 secondes).

de culture ne jouent pas de rôle notable dans la régulation de l'adhésion d'*E. histolytica* sur un substrat en verre.

II.B.2.b Interactions électrostatiques

Nous avons également testé si, par l'utilisation d'interactions électrostatiques de surface, la motilité pouvait être affectée. Dans ce but, nous avons utilisé des lamelles de verre préalablement incubées avec de la polylysine : l'adsorption de polylysine sur le substrat permet d'y placer des charges cationiques ; ce moyen est souvent employé pour promouvoir l'adhésion et l'étalement cellulaire par des forces de nature électrostatique ([Mazia *et al.*, 1975]). En pratique, nous n'avons pas vu d'effet notable sur la migration cellulaire (voir figure II.6). Des explications possibles peuvent être un écrantage de l'interaction via des protéines présentes en solution, ou une fixation insuffisante de la polylysine sur le substrat au regard des forces développées par les cellules, qui pourraient être capables d'arracher la polylysine du substrat (la polylysine étant fixée sur le substrat par adsorption simple et non par liaisons covalentes).

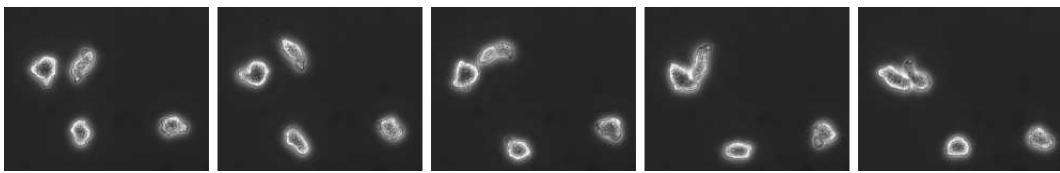


FIG. II.6: Mouvement d'une amibe sur un substrat recouvert de polylysine (intervalle temporel entre images : 10 secondes) ; la motilité des cellules n'est pas notablement affectée par rapport à du verre non traité.

II.B.2.c Interactions spécifiques

Dans ce qui précède, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modification de motilité via des traitements de surface jouant sur l'hydrophobicité ou les charges électrostatiques de surface ; or, pouvoir contrôler la motilité via des traitements de surface serait d'une utilité certaine, afin de pouvoir étudier *in vitro* l'impact d'une adhésion accrue sur la motilité d'*E. histolytica*. Faute d'avoir pu augmenter l'adhésion via des interactions non spécifiques, nous nous sommes donc intéressés aux processus d'adhésion spécifiques d'*E. histolytica*. Il est notamment établi que la lectine Gal-GalNAc joue un rôle important dans les processus d'invasion *in vivo*. Des partenaires d'interaction de cette lectine sont le galactose ou la N-acetylgalactosamine. Nous avons pu obtenir des lamelles de verres sur lesquelles était greffé du galactose (*coll. Vincent Semetey - institut Curie*) et observer la motilité d'*E. histolytica* sur ces lamelles. Si en première approximation la motilité n'est pas affectée (voir figure II.7), on remarque néanmoins des points sporadiques d'adhésion (voir figure II.8).



FIG. II.7: Mouvement d'une amibe sur un substrat recouvert de galactose (intervalle temporel entre images : 10 secondes) ; comme sur du verre non traité, les cellules étendent des protrusions et se déplacent.

En conclusion, un traitement de surface galactose n'entraîne pas un changement important de motilité, mais un renforcement de l'adhésion semble néanmoins perceptible. Il serait intéressant de pouvoir disposer d'un substrat avec un traitement de surface N-acetylgalactosamine qui a été décrit comme 30 fois plus efficace que le galactose ([Frederick and Petri, 2005]), afin, peut-être, d'avoir un effet qualitatif important qui pourrait modifier notablement la motilité (et, qui sait, d'observer un type de mouvement très différent, par exemple analogue à des cellules très adhésives telles les kératocytes).

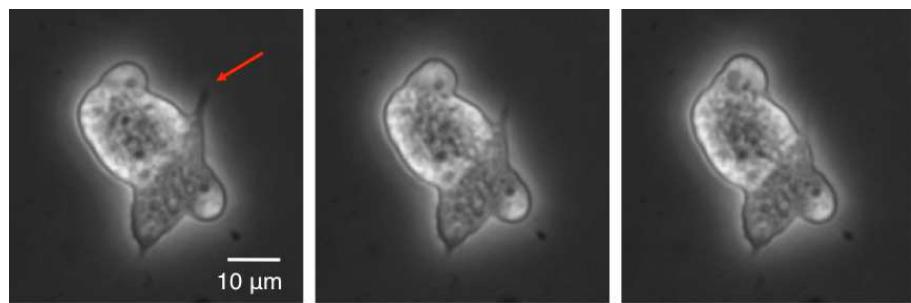


FIG. II.8: Mouvement d'une amibe sur un substrat recouvert de galactose : repéré par la flèche rouge, on remarque un point d'adhésion résiduel qui finit par se rompre, probablement sous l'effet de la tension membranaire (intervalle temporel entre images : 0,33 secondes).

II.B.3 Visualisation des adhésions

Dans la culture quotidienne d'*E. histolytica*, il est assez notable que la cellule n'a qu'une adhésion réduite sur un substrat en verre⁶, à la différence par exemple de cellules comme des fibroblastes : une traduction en est encore la forme adoptées par ces cellules, assez arrondie pour *E. histolytica* (figure I.24), très aplatie pour des fibroblastes.

Nous avons étudié plus en détails la relation entre localisation des adhésion et motilité, en imageant simultanément les adhésions (par microscopie RICM⁷) et la forme globale de la cellule (par microscopie en contraste de phase) (figure II.9). Une première remarque est que l'interaction par rapport au substrat est assez étendue en surface, et n'est pas simplement limitée à quelques contacts discoïdes réduits : les processus d'interaction sont donc bien de l'adhésion plutôt qu'une simple friction. L'observation permet encore de confirmer que les protrusions se développent de façon tridimensionnelle, au dessus du substrat ; ce n'est que dans un second temps qu'elles adhèrent au substrat, ce qui leur permet de pérenniser le déplacement de la cellule ; d'autre part, dans les zones où transitoirement se produisent des rétractions, on observe des phénomènes de « pelage », là encore caractéristiques de processus d'adhésion.

II.B.4 Conclusions

Nos observations indiquent donc que *E. histolytica* n'a pas besoin du substrat pour développer ses protrusions (à la différence par exemple d'un kératocyte qui utilise le substrat pour transmettre une force locale, et s'arrondit en l'absence d'adhésion) : le rôle du substrat pour l'amibe n'est donc que de

⁶ainsi, il suffit de secouer un peu brusquement le récipient de culture pour en détacher les cellules.

⁷Reflection Interference Contrast Microscopy.

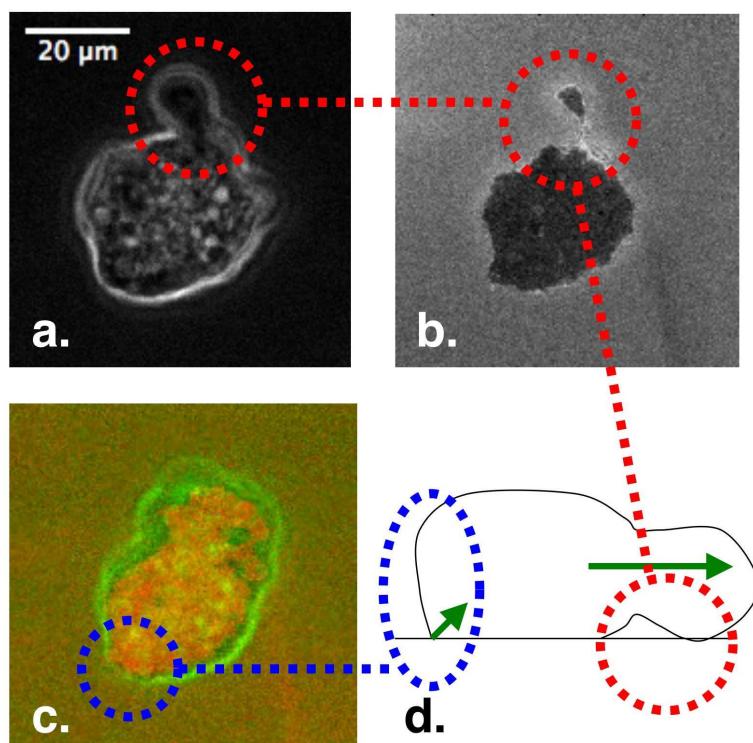


FIG. II.9: Visualisation des adhésions au cours de la motilité. a). Image en contraste de phase. b). Image RICM. Les régions noires correspondent aux zones où la cellule est plus proche du substrat que $\lambda/4$, soit une centaine de nanomètres. Image prise au même moment que l'image (a), on observe sur la partie supérieure de l'image une protrusion qui se développe, au dessus du substrat, et qui ne fait contact qu'à son extrémité. c). Autre image, prise quelques secondes plus tard. Superposition du contraste de phase (en vert) et du RICM (en rouge). Le contour RICM est beaucoup plus proche du contour vu en contraste de phase sur la partie inférieure de l'image, qui correspond à la zone en rétraction de la cellule : ceci indique un effet de « pelage » par rapport au substrat. d). Vue schématique des processus de protrusion et de pelage.

servir de point d'appui ultérieur pour stabiliser les protrusions et permettre un déplacement dans un milieu visqueux.

Un inconvénient de cette faible dépendance à l'adhésion est que nous n'avons pas à ce jour de méthode éprouvée permettant de moduler le comportement motile via l'adhésion⁸, bien qu'une adhésion spécifique via le N-acetylgalactosamine soit une voie prometteuse. *A contrario*, un avantage de cette faible dépendance à l'adhésion est que l'observation *in vitro* sur substrat en verre est beaucoup plus représentative de la réalité *in vivo* pour *E. histolytica*, que pour d'autres types cellulaires qui eux développent des adhésions fortes.

Du fait que les protrusions se développent à 3 dimensions, même sur un substrat bidimensionnel, nous aurions pu choisir de faire de l'imagerie à 3 dimensions (avec acquisition de différents plans successifs en hauteur) et à fort

⁸donc des techniques telles que le micropatterning ne sont pas utilisables.

grossissement (de façon à avoir un sectionnement optique optimal) ; mais, pour un système d'acquisition donné, l'imagerie 3D entraîne une diminution drastique de la résolution temporelle (au profit de l'information sur la dimension axiale). Comme une cadence d'acquisition vidéo était requise pour capturer les détails des éléments protruifs les plus rapides que nous pouvions voir, nous avons choisi d'utiliser principalement une imagerie par contraste de phase à faible grossissement (c'est à dire : avec un faible sectionnement optique), ce qui permet ainsi l'observation d'un seul plan « moyen », à la cadence d'acquisition nominale de la caméra.

II.C Caractérisation globale de la migration

II.C.1 Relation entre dynamique protruive et allure du déplacement quadratique moyen aux temps courts

Pour étudier le comportement migratoire de la cellule, une manière simple est de s'intéresser au déplacement de son « centre géométrique ⁹ », en premier lieu le déplacement quadratique moyen de ce centre. Un préalable est la détection des contours sur cellule entière (détails algorithmiques en annexe B.1).

II.C.1.a Allure théorique du déplacement quadratique moyen pour une marche aléatoire

Le déplacement quadratique moyen d'une marche aléatoire dont les pas s'effectuent à la vitesse v et avec un coefficient de diffusion D a pour expression ([Kubo *et al.*, 1991]) :

$$\langle r^2(t) \rangle = 2D \left(t - D \frac{1 - e^{-\frac{v^2 t}{D}}}{v^2} \right) \quad (\text{II.1})$$

Si l'on note $\tau = \frac{D}{v^2}$ le temps moyen de changement de direction, on retrouve bien les comportements aux limites attendus :

- pour $t \ll \tau$, $\langle r^2(t) \rangle \approx v^2 t^2$: le mouvement vu à cette échelle de temps est balistique.
- pour $t \gg \tau$, $\langle r^2(t) \rangle \approx 2Dt$: l'exposant du déplacement quadratique moyen tombe à 1, traduisant le caractère brownien du déplacement vu à cette échelle de temps.

⁹ce centre correspond au centre du polygone défini par l'enveloppe de la cellule dans le plan d'observation.

L'allure générale est donnée figure II.10. Ainsi, l'exposant 1 aux intervalles de temps longs est indépendant de la cinétique précise des pas élémentaires ; mais l'exposant 2 aux intervalles de temps courts résulte de la nature balistique du mouvement.

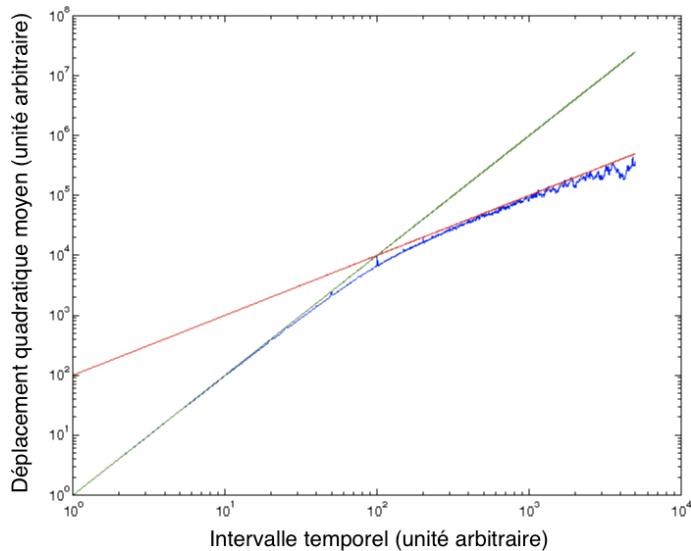


FIG. II.10: En bleu : déplacement quadratique moyen pour une marche aléatoire simulée avec des changements de direction tous les 100 pas de temps (vitesse : 1 pas d'espace par unité de temps) ; en vert : mouvement dirigé (donc d'exposant 2) ; en rouge : courbe d'exposant 1.

II.C.1.b Comparaison entre déplacement quadratique moyen théorique et mesures antérieures

Or, le déplacement quadratique moyen mesuré dans les travaux antérieurs à cette thèse ([Coudrier *et al.*, 2005]) était sensiblement différent de la forme théorique de l'équation II.1 : sa forme était celle d'une loi de puissance simple d'exposant compris entre 1 et 2, la valeur exacte de l'exposant étant liée aux conditions de migration (mutants, propriétés de l'environnement, ...) (voir figure II.11).

II.C.1.c Hypothèse : dynamique « explosive »

Comment réconcilier les mesures expérimentales (section II.C.1.b) avec la courbe théorique attendue (section II.C.1.a) ?

On a vu que l'exposant 2 aux temps courts est intimement relié à l'hypothèse d'une cinétique balistique. Or, une observation grossière de la motilité d'*E. histolytica* laisse à penser que la cinétique des protrusions n'est pas uniforme, mais caractérisée par des hétérogénéités de vitesse au cours du temps,

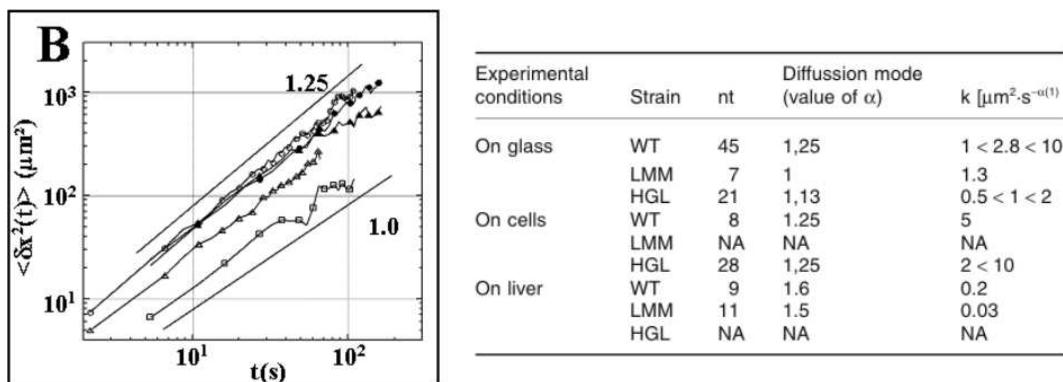


FIG. II.11: Déplacements quadratiques moyens observés par [Coudrier *et al.*, 2005], avec interpolation en loi de puissance sous la forme $\langle \delta x^2(\Delta t) \rangle = k \cdot \Delta t^\alpha$. Signification des abréviations : LMM = light meromosin dominant negative (phénotype déficient en myosine II) ; HGL : heavy chain Gal-GalNAc dominant negative (phénotype d'adhésion réduite en affectant la lectine Gal-GalNAc).

voire même une dynamique « explosive », qui pourrait influer directement sur la loi de puissance aux temps courts. Et il est raisonnable de penser que cette dynamique des pas varie de façon importante selon que l'on considère des mutants, ou que l'on varie les propriétés de l'environnement, avec comme résultat une influence sur la loi de puissance aux temps courts, ce qui pourrait expliquer les différentes mesures d'exposants de la loi de puissance obtenues dans [Coudrier *et al.*, 2005].

Nous avons donc effectué des simulations de marches aléatoires avec des dynamiques de pas de la forme $s(t) = (\frac{t}{\tau})^\mu$, avec s l'abscisse curviligne, τ la durée du pas, et μ l'exposant (figure II.13) ; dans ce qui suit, on fera référence à cette cinétique de vitesse algébrique sous le vocable de dynamique « explosive », par opposition à la dynamique balistique usuelle caractérisée par une vitesse uniforme¹⁰. Le résultat de ces simulations de dynamique « explosive », représenté sous forme de déplacement quadratique moyen, se trouve sur la figure II.12 : la conclusion est qu'une vitesse de pas non-uniforme peut fortement affecter l'exposant de la loi de puissance aux intervalles de temps courts du déplacement quadratique moyen.

Ce faisant, nous avons supposé que la dynamique du bord cellulaire était corrélée sans facteur correctif notable à la dynamique du centre de masse. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons fait quelques calculs à partir d'un cas géométrique théorique (protrusion en demi-disque de « largeur » constante au cours de sa progression, détails en annexe D), qui nous permettent de conclure que la dynamique du centre de masse est reliée directement (sans facteur correctif notable) à la dynamique du bord cellulaire ; une dynamique « explosive » des pas se traduira donc par une dynamique « explosive » du centre de masse. Ainsi, on peut négliger la géométrie latérale des protrusions

¹⁰le cas balistique correspondant au cas particulier $\mu = 1$.

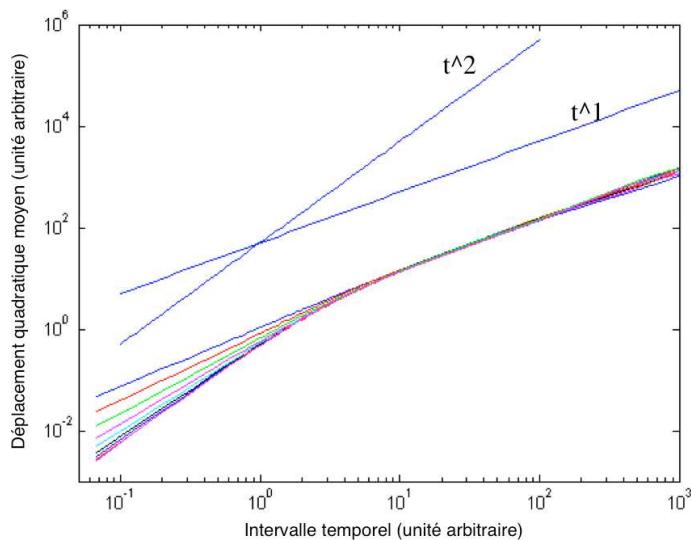


FIG. II.12: Déplacement quadratique moyen pour des marches aléatoires simulées avec des dynamiques de vitesse de pas en $(\frac{t}{\tau})^\mu$ (avec τ la durée du pas, et μ l'exposant). En faisant varier μ entre 0 et 1, on obtient une gamme d'exposants pour le déplacement quadratique moyen aux temps courts variant entre 2 ($\mu \rightarrow 1$) et 1 ($\mu \rightarrow 0$).

et considérer que la dynamique du centre de masse reflète la dynamique du bord cellulaire.

De ceci, on pourrait extrapoler que pour obtenir une moyenne du comportement cinétique des protrusions, il suffit de détecter le contour complet de la cellule sur tout le bord cellulaire, puis de s'intéresser à l'exposant du déplacement quadratique moyen aux temps courts : ce qui est notablement plus facile que de devoir segmenter temporellement et spatialement une séquence d'images pour extraire des dynamiques individuelles de protrusions et calculer ensuite leur comportement moyen.

Mais commençons par tester cette hypothèse d'une influence de dynamique explosive sur l'exposant du déplacement quadratique moyen aux temps courts, 2 types d'investigations sont nécessaires à partir d'enregistrements de trajectoires d'amibes avec une résolution spatio-temporelle améliorée par rapport aux expériences de [Coudrier *et al.*, 2005] :

- quelle est la dynamique précise du centre de masse en terme de vitesse ? La vitesse est-elle uniforme ? Variable ? Comporte-t'elle des phases « explosives » ? ... (section II.C.1.d).
- quelle est l'allure du déplacement quadratique moyen avec une meilleure résolution temporelle que [Coudrier *et al.*, 2005] ? (section II.C.1.e).

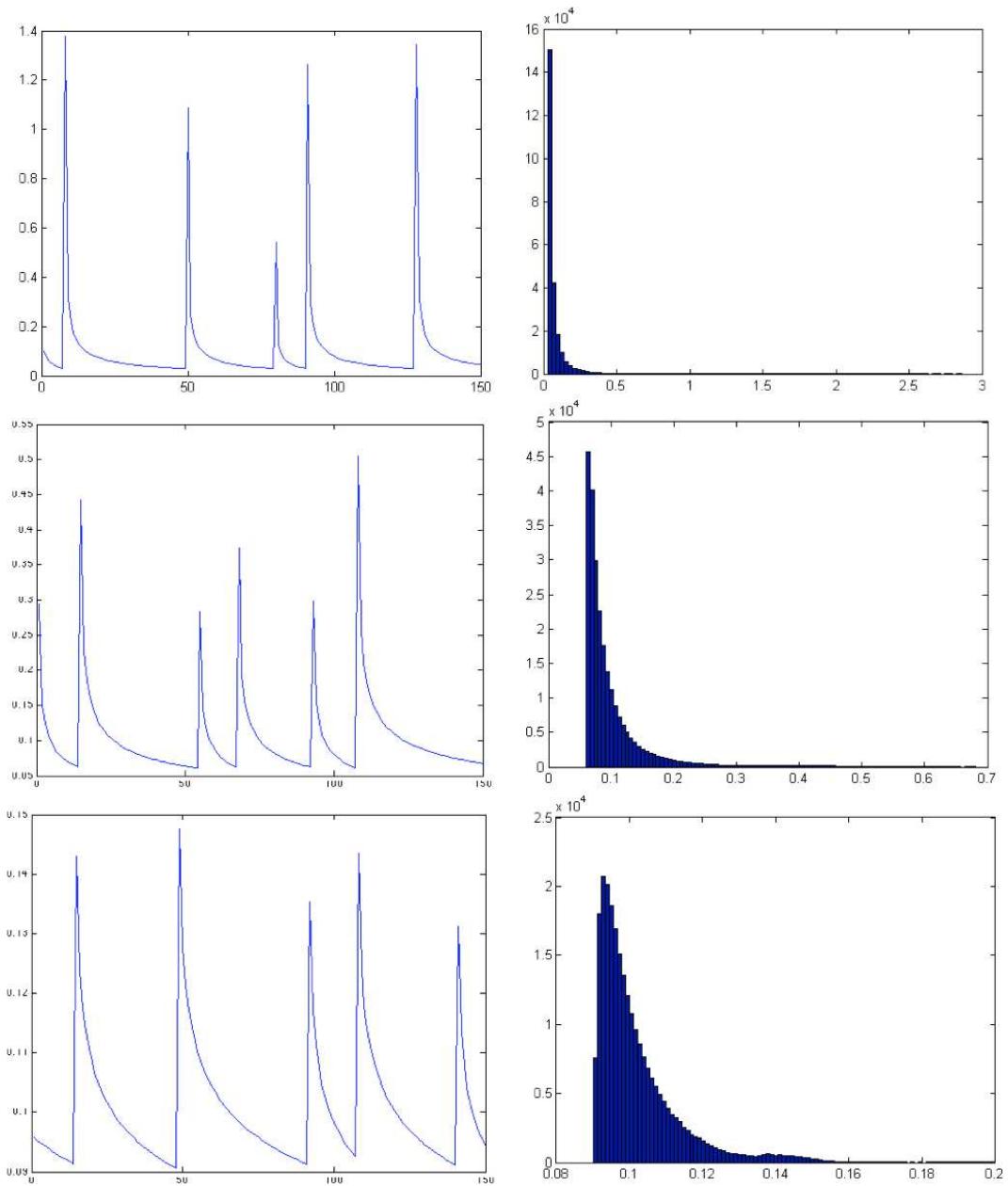


FIG. II.13: Exemples de simulations pour des marches aléatoires avec des dynamiques de vitesse de pas en $(\frac{t}{\tau})^\mu$. Longueur des marches individuelles : de l'ordre de 250 000 pas de temps. A gauche : vitesse au cours du temps (unités arbitraires) ; à droite : distribution des vitesses. Du haut vers le bas : $\mu = 0,3$, $\mu = 0,6$, $\mu = 0,9$: plus μ est proche de zéro et plus les valeurs de vitesse lors des départs protrusifs sont singulières par rapport à la vitesse moyenne.

II.C.1.d Dynamique du centre de masse

Un exemple de mesure de vitesse d'un centre cellulaire est montré sur la figure II.14 : on trouve qu'effectivement, comme attendu, la vitesse du centre cellulaire varie assez fortement au cours du temps (selon qu'une protrusion est

en train de se développer ou non), mais l'hétérogénéité de la distribution des vitesses n'est pas excessive et s'apparente aux simulations avec le paramétrage le moins hétérogène (cf. figure II.13), pour lesquelles le déplacement quadratique moyen aux temps courts est similaire à celui d'une dynamique de pas balistique.

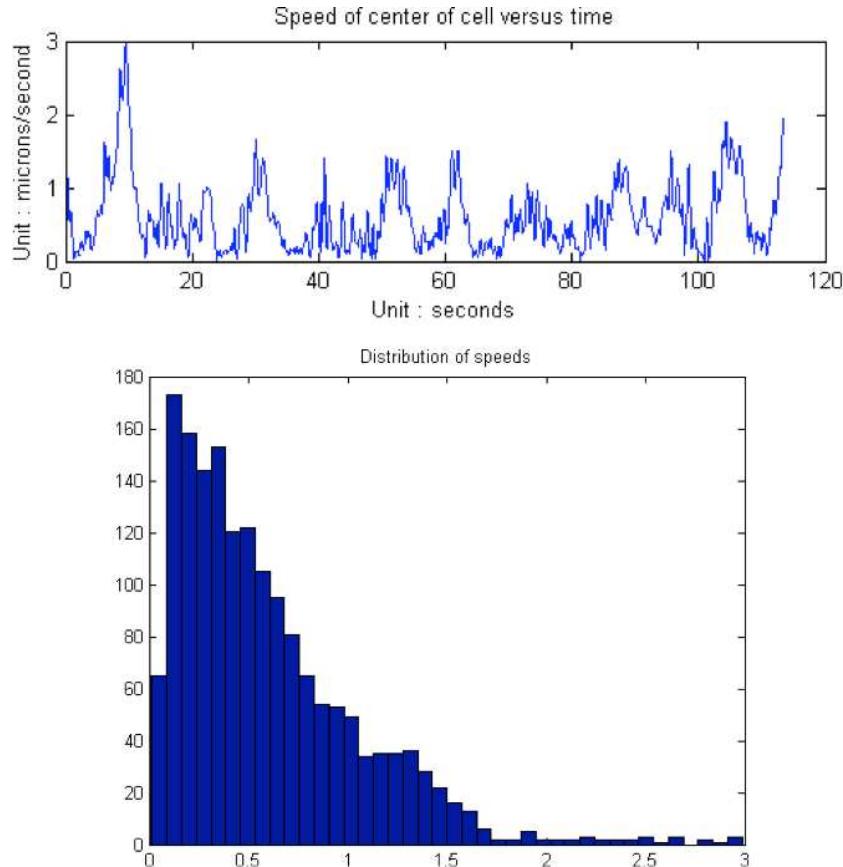


FIG. II.14: Exemple de l'allure de la vitesse du centre géométrique de la cellule. En haut : vitesse au cours du temps (obtenue après filtrage des données brutes suivant la méthode d'analyse décrite en annexe C). En bas : histogramme des vitesses.

II.C.1.e Déplacement quadratique moyen aux temps courts

Des exemples de déplacement quadratique moyen obtenus pour différentes cellules figurent sur le schéma II.15. La cadence d'acquisition est de 15 images par secondes, ce qui permet d'accéder à des intervalles de temps d'un ordre de grandeur inférieur aux analyses précédentes¹¹. En bornant l'analyse aux intervalles de temps inférieurs à 10 secondes (figure II.15), on observe un comportement qui peut être approximé par une loi de puissance : l'exposant de cette loi a été mesuré à $1,82 \pm 0,1$, ce qui est notablement plus important que l'exposant déterminé dans [Coudrier *et al.*, 2005] pour des intervalles de temps

¹¹montrées figure II.11

plus élevés¹². La dispersion des préfacteurs est notable mais comparable aux mesures précédentes, et se comprend par la diversité d'état physiologique des cellules qui a une influence sur leurs capacité de motricité.

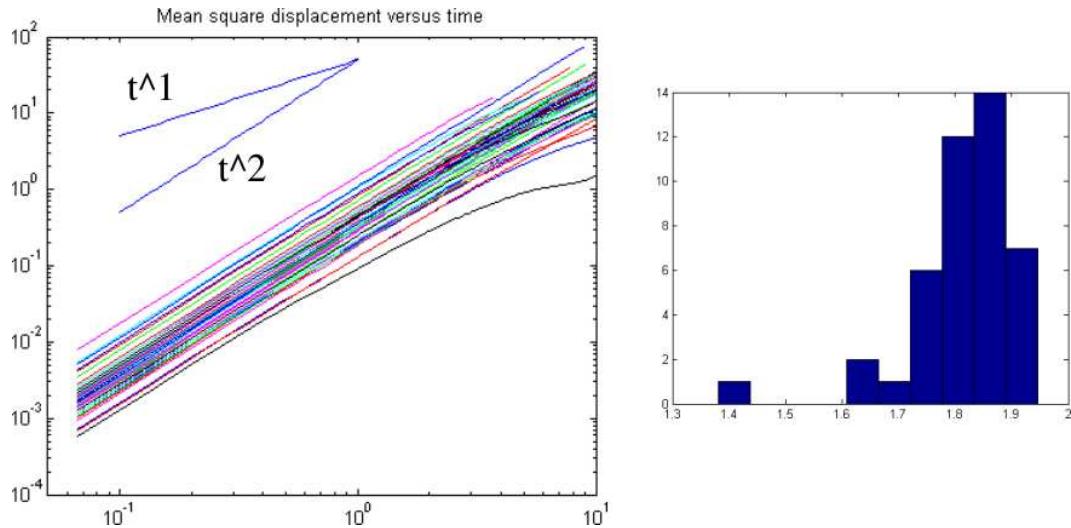


FIG. II.15: a). Déplacement quadratique moyen (exprimé en microns carrés) en fonction de l'intervalle temporel (exprimé en secondes) pour des amibes sur du verre non traité ($N = 43$). b). Histogramme des exposants mesurés par approximation en loi de puissance. La valeur moyenne des exposants est $1,82 \pm 0,1$.

En limitant l'analyse à des temps plus courts (intervalles de temps inférieurs à 1 seconde, figure II.16), la valeur mesurée pour l'exposant atteint $1,95 \pm 0,03$: l'exposant de la loi de puissance mesurée est donc voisin de l'exposant 2 théorique d'une marche balistique ; ainsi l'exposant $1,82 \pm 0,1$ mesuré sur des intervalles de temps inférieurs à 10 secondes résulte de l'infléchissement de la courbe à l'approche du changement de régime balistique / brownien, et non pas d'une loi de puissance particulière.

II.C.1.f Conclusions

On peut donc conclure que les hétérogénéités de vitesses mesurées sont réelles, mais insuffisantes pour générer une loi d'échelle différente d'une loi balistique comme il avait été envisagé section II.C.1.c. On peut donc déduire de ceci que les exposants intermédiaires entre loi diffusive et loi balistique mesurés dans [Coudrier *et al.*, 2005] reflètent le chevauchement entre une dynamique balistique aux temps courts et un comportement aléatoire aux temps longs (ce comportement aux temps longs fait l'objet d'une étude dédiée dans ce manuscrit à la section II.C.2.a).

¹²ainsi le graphe II.11 montrait un exposant 1,25 pour le déplacement d'amibes sur du verre standard.

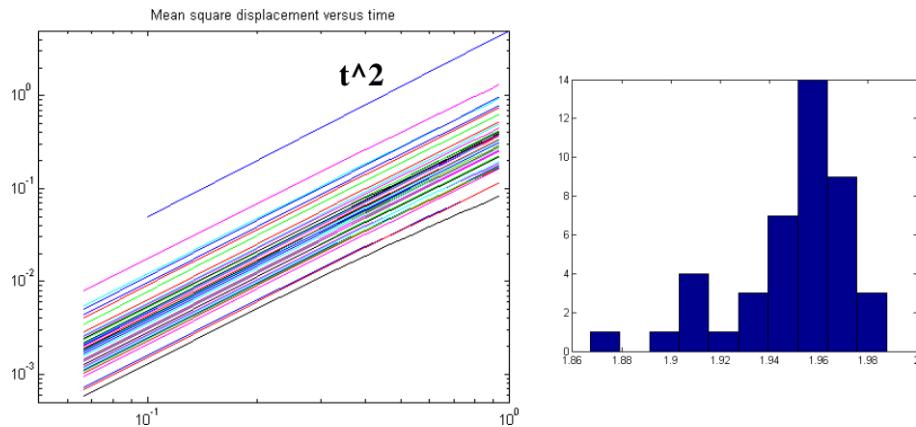


FIG. II.16: Idem figure II.15 en réduisant la fenêtre temporelle d'analyse du déplacement quadratique à < 1sec ($N = 43$). L'exposant moyen mesuré en approximant ces courbes par une loi de puissance est $1,95 \pm 0,03$.

II.C.2 Détection des événements protrusifs et statistiques associées

II.C.2.a Déplacement quadratique moyen aux temps longs

Dans le paragraphe précédent, nous avons étudié la dynamique protrusive aux temps courts via l'allure aux temps courts du déplacement quadratique moyen. Mais la dynamique aux temps longs (devant la période des protrusions) est également digne d'intérêt puisqu'elle est une signature du caractère aléatoire (ou biaisé) de la génération des protrusions. Une analyse plus globale du déplacement quadratique moyen est donc utile :

- la mesure de l'exposant via une approximation en loi de puissance aux temps longs permet de confirmer ou infirmer la corrélation entre protrusions successives.
- la transition entre mouvement dirigé aux temps courts et mouvement aléatoire aux temps longs donne une indication du temps moyen entre protrusions.

La figure II.17 présente l'allure du déplacement quadratique moyen pour des trajectoires longues d'amibes (grossissement minimal, pour pouvoir enregistrer des trajectoires sur plusieurs centaines de secondes). L'approximation sous forme d'une loi de puissance donne pour l'exposant une mesure de $0,87 \pm 0,53$. La valeur moyenne est donc proche de l'exposant 1 théorique d'une marche aléatoire parfaite, mais la dispersion est importante, sans compter que pour un tiers des trajectoires la régression sous forme de loi de puissance ne donne pas de résultat convergent.

¹³ne sont prises en compte que les cas où l'approximation en loi de puissance donne un résultat convergent, ce qui n'est le cas que pour 283 trajectoires sur 428.

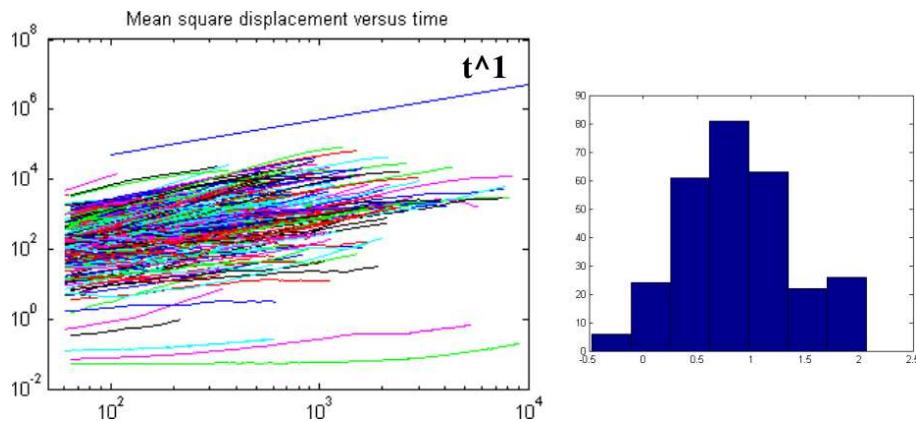


FIG. II.17: Déplacement quadratique moyen pour des intervalles de temps > 60 sec. A droite : histogramme des exposants par approximation en loi de puissance¹³, moyenne de $0,87 \pm 0,53$.

Or, avant de conclure que cette dispersion traduit des dynamiques individuelles sur- ou sous-diffusives, il est important de se rappeler que ces trajectoires sont des enregistrements à temps fini ; or, même sur des trajectoires parfaitement browniennes, l'exposant du déplacement quadratique moyen mesuré sur des marches à temps fini montre une dispersion, d'autant plus importante que la longueur des trajectoires est faible ([Coscoy *et al.*, 2007]). Nous avons donc simulé un jeu de marches browniennes avec des caractéristiques (vitesses et temps protrusif) comparables aux observations cellulaires (figure II.18) ; les résultats sont les suivants :

- la régression sous forme de loi de puissance ne donne une mesure d'exposant que pour les $\frac{2}{3}$ des trajectoires¹⁴, malgré le caractère parfaitement contrôlé de la génération aléatoire des pas. Ceci est donc parfaitement comparable aux résultats de mesure sur cellules ; ainsi, malgré la mesure de trajectoires aussi longues que possible expérimentalement, le caractère stochastique d'une marche aléatoire suffit à ce qu'une part importante des trajectoires mesurées échappe à une régression sous forme de loi de puissance.
- la valeur de l'exposant mesurée sur les simulations est $0,95 \pm 0,32$. La dispersion est donc comparable aux mesures sur cellules réelles, sans qu'il y ait besoin d'invoquer des sources de dispersion supplémentaires (durée des pas, amplitude...). Les mesures réelles sont donc compatibles avec un processus de génération des trajectoires basé sur un générateur aléatoire.

En conclusion, l'allure du déplacement quadratique moyen aux temps longs est compatible avec un générateur aléatoire, mais la dispersion intrinsèque aux mesures à temps fini entraîne une dispersion relativement importante. Du fait de cette dispersion, l'analyse du déplacement quadratique moyen à l'aide d'une formule globale comme II.1 ne nous a jamais donné de résultats concluants dans nos tentatives d'obtenir, par exemple, la période moyenne des protrusions à

¹⁴convergence pour 292 trajectoires sur 428.

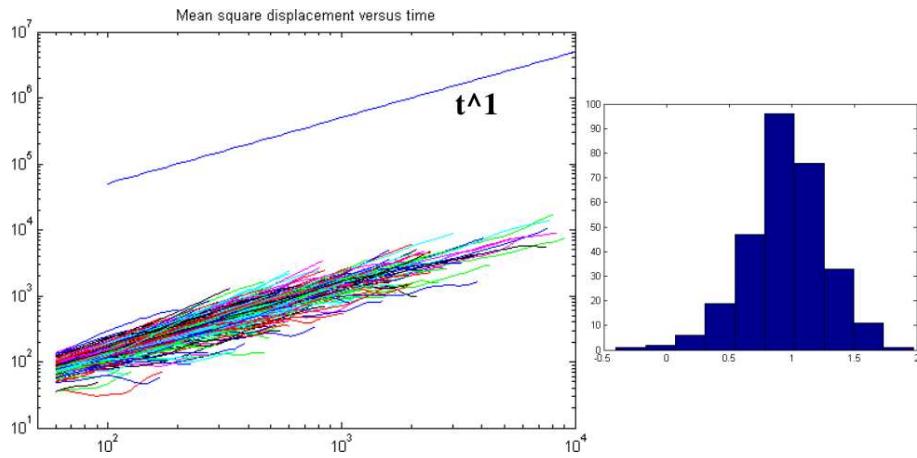


FIG. II.18: Déplacement quadratique moyen pour un jeu de marches aléatoires simulées avec les mêmes paramètres de durées que le jeu de données de la figure II.17, avec une vitesse de pas uniforme à $1 \mu \text{ m/sec}$ et un temps entre pas de 15 sec. A droite : histogramme des exposants obtenus par approximation en loi de puissance.

partir de l'analyse du déplacement quadratique moyen.

II.C.2.b Décorrération directionnelle

Le déplacement quadratique moyen ne nous ayant pas permis d'obtenir une mesure globale de la période moyenne des protrusions, nous avons cherché d'autres techniques d'analyses. Nous allons considérer ici une mesure de corrélation directionnelle du vecteur vitesse de la trajectoire du centre géométrique de la cellule : pour un intervalle de temps court devant la durée moyenne des protrusions, les directions des vecteurs vitesse le long de la trajectoire sont corrélées ; mais lorsqu'on augmente l'intervalle temporel d'analyse, on a progressivement décorrération directionnelle, avec un temps de décorrération correspondant à la période entre 2 protrusions. On considère comme observable de la corrélation directionnelle l'expression II.2, où \vec{u} est le vecteur unitaire lié au vecteur vitesse de la trajectoire ; les analyses sont détaillées figure II.19 : on observe qu'un jeu de marches aléatoires avec un pas de temps de l'ordre de la dizaine de secondes donne un graphe similaire aux données réelle ; nous n'avons pas inclus ici de sources de dispersion additionnelles dans les simulations (tenant compte par ex. d'une dispersion de vitesse instantanée, de longueur de pas...), ce qui entraîne une dispersion un peu réduite pour les simulations par rapport aux données réelles, mais ne modifie pas fondamentalement le résultat final.

$$\text{corr}(\Delta t) = < \overrightarrow{u(t)} \cdot \overrightarrow{u(t + \Delta t)} > \quad (\text{II.2})$$

On peut conclure de la figure II.19 que les temps typiques de décorrération

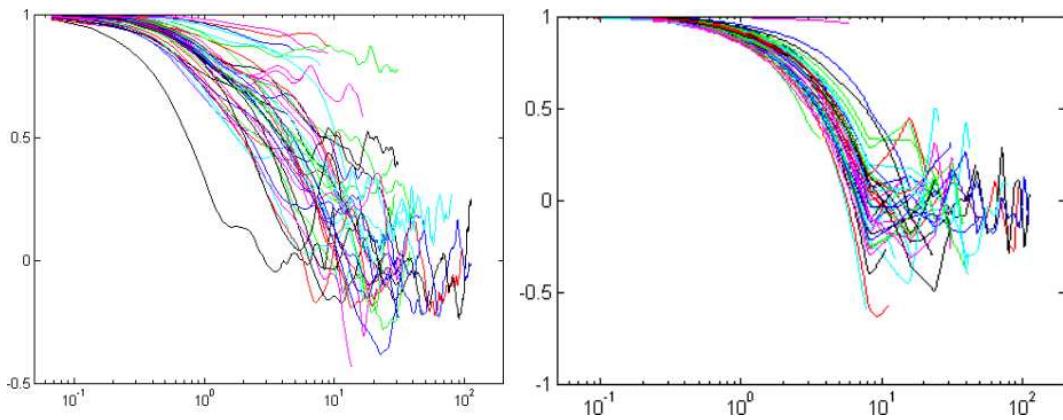


FIG. II.19: A gauche : décorrélation directionnelle en fonction de Δt (en secondes) pour quelques trajectoires d'amibes. A droite : une simulation de marches aléatoires avec un pas de temps de 8 secondes.

directionnelle sont de l'ordre de la dizaine de secondes, en bon accord avec l'impression visuelle du temps typique entre protrusions.

II.C.2.c Variation d'aire au cours du temps : corrélation avec l'extension de protrusions, et mesure de durée du cycle protrusif

Un autre indicateur de la dynamique des protrusions est l'aire géométrique apparente de la cellule au cours du temps. Lorsque l'on trace cette aire géométrique en fonction du temps, on remarque des variations (figure II.20), dont on montrera qu'elles sont corrélées avec l'extension des protrusions (partie supérieure du graphe II.21).

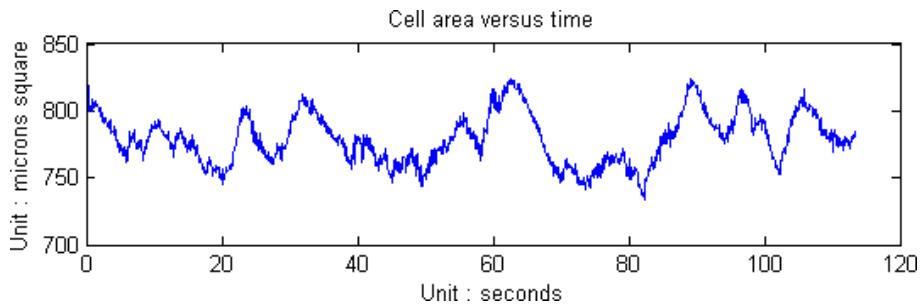


FIG. II.20: Aire géométrique apparente de la cellule au cours du temps. L'aire apparente de la cellule n'est pas constante mais connaît des variations de l'ordre de 10 %.

On peut interpréter ces petites variations d'aire comme résultant du déplacement d'une cellule de volume constant sur son support : lors de l'extension d'une protrusion, l'aire globale augmente puisque la cellule « s'étire » dans la

direction de la protrusion ; ensuite, la cellule tend à se contracter globalement, ce qui a pour résultat de rétracter le bord cellulaire dans son ensemble et tend à « diminuer » son aire géométrique (figure II.21) : la variable d'ajustement cachée est alors la hauteur cellulaire.

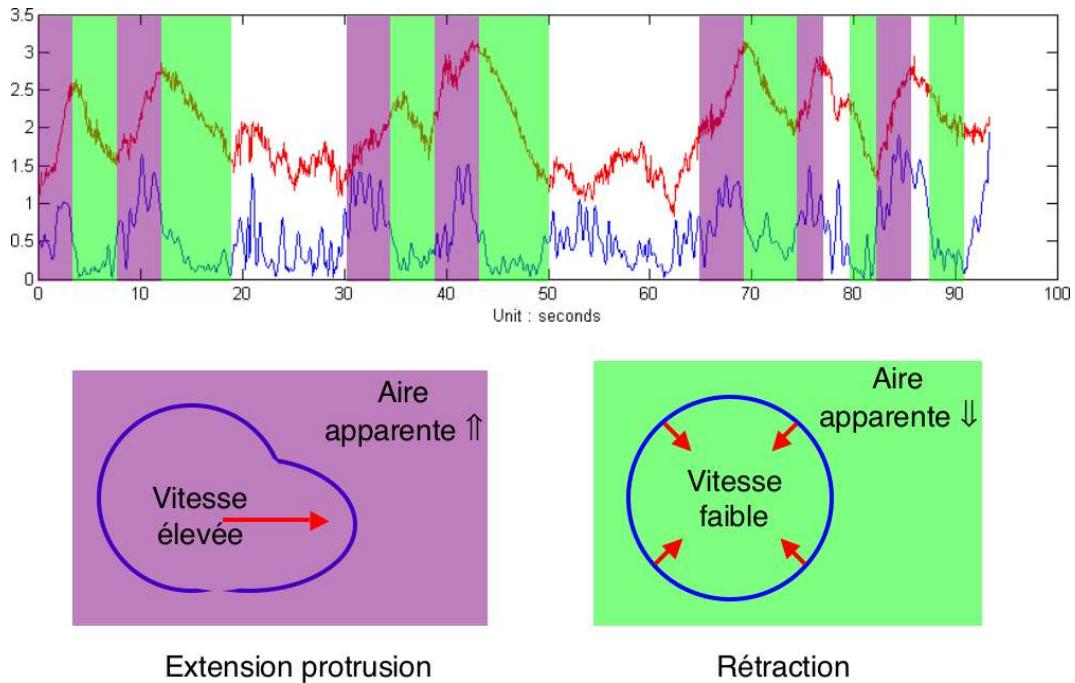


FIG. II.21: En haut : graphe montrant l'aire apparente (en rouge) et la vitesse du centre (en bleu) (unités arbitraires en ordonnées ajustées pour permettre une visualisation conjointe correcte). On observe (en violet) une corrélation entre augmentation d'aire apparente et vitesse élevée du centre (correspondant aux phases de protrusion), et (en vert clair) une corrélation réciproque entre diminution d'aire apparente et faible vitesse du centre (phases de rétraction).

On peut donc utiliser cet indicateur simple qu'est l'aire géométrique pour faire des mesures quantitatives sur le cycle protrusions - rétractions. On obtient (figure II.22) un cycle complet d'une durée typique de 5 à 10 secondes, en accord avec les mesures de corrélation directionnelles de la section II.C.2.b ; on observe également une asymétrie entre protrusions et rétractions : les protrusions sont d'une durée plus faible, donc d'une intensité relative plus forte, que les rétractions.

II.C.2.d Carte des déplacements locaux de la cellule

Dans le paragraphe qui précède, on a mis en évidence une asymétrie dynamique entre protrusions et rétractions. Cependant, l'indicateur utilisé (aire géométrique) intègre à la fois des effets locaux d'expansion et de contraction. Il en est de même pour le mouvement du centre géométrique utilisé préalablement. Pour découpler les effets de protrusion et de rétraction, une méthode

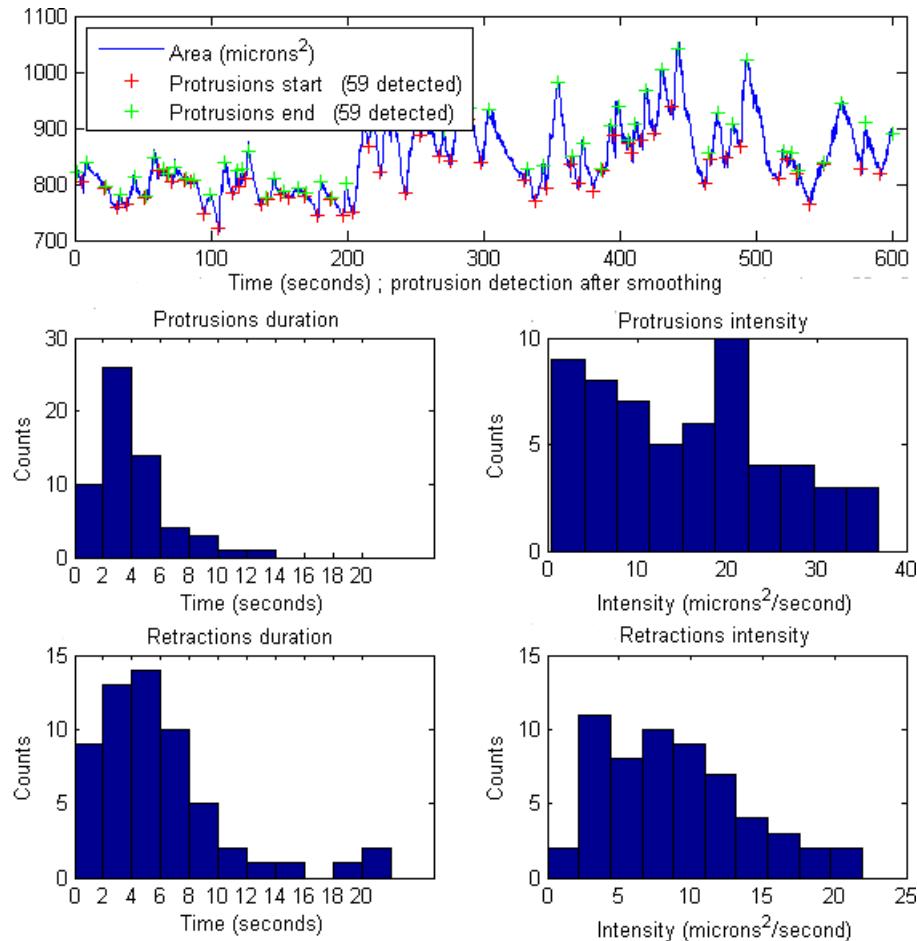


FIG. II.22: En haut : aire géométrique apparente en fonction du temps. Après lissage approprié pour diminuer le bruit, on peut assimiler les minima locaux à des débuts de protrusions et les maxima locaux à leur fin. Milieu : statistiques sur les protrusions, resp. histogramme des durées (à gauche) et des intensités (à droite). Bas : statistiques sur les rétractions, resp. histogramme des durées (à gauche) et des intensités (à droite).

est de faire des mesures locales de déplacement du bord cellulaire. Une analyse de ce type est décrite figure II.23 : en raison de l'émission des protrusions, le périmètre géométrique varie quelque peu, ce qui est apparent sur le bas de la figure ; les spots en rouge correspondent aux protrusions, et on les observe sur tout le pourtour cellulaire, sans régularité spatiale notable. Les informations qualitatives obtenues sont l'absence de corrélation marquée entre lieux de protrusions, et la présence principalement d'une seule protrusion à la fois.

On peut se livrer à des analyses un peu plus quantitatives en traçant les vitesses maximales respectives de protrusion et de rétraction au cours du temps (figure II.24). Une conclusion est que les phénomènes d'expansion et de contraction sont des phénomènes cinématiquement distincts (en amplitude et en temps caractéristique), ce qui confirme les résultats obtenus par l'indicateur global qu'était l'aire géométrique (section II.C.2.c) : les protrusions permettent ainsi

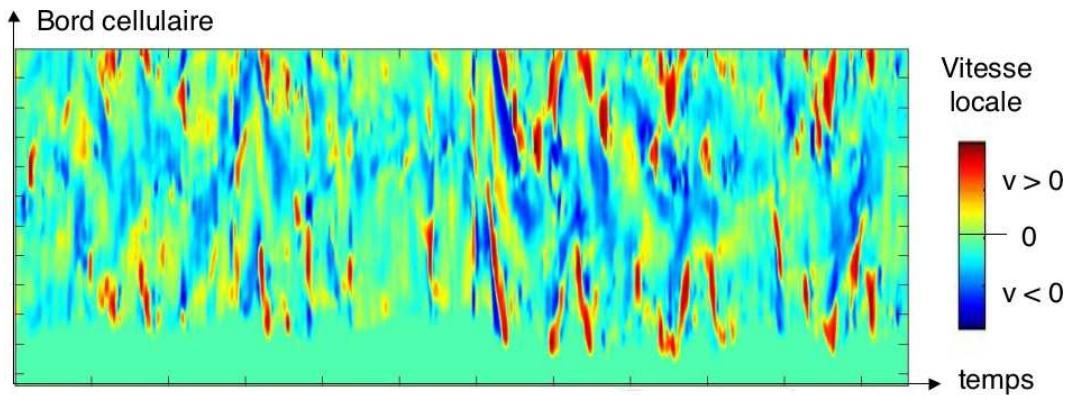


FIG. II.23: Image représentant les déplacements locaux du bord cellulaire. En abscisse : temps (durée totale : un peu plus de 6 minutes); en ordonnée : position le long du contour cellulaire (l'origine est choisie de façon initialement arbitraire, puis sa position est déterminée de proche en proche sur chaque image en supposant que ce point se déplace de façon normale au contour); la couleur est fonction de la vitesse locale de déplacement (bleu pour les rétractions, rouge pour les protrusions, vert pour les vitesses faibles). On notera l'analogie du résultat obtenu avec l'analyse de la figure 3 de [Yoshida and Soldati, 2006].

une extension locale rapide, tandis que la rétraction agit beaucoup plus uniformément. On verra par la suite (section II.F) comment interpréter ces résultats.

A partir d'un graphe tel que celui de la figure II.23, il est tentant de chercher à extraire automatiquement les localisations précises en temps et espace des protrusions ; le graphe II.23 est difficilement exploitable en tant que tel puisqu'il représente une projection (suite temporelle de contours bidimensionnels, vers tableau 2D avec un axe spatial et un axe temporel). Nous avons donc mis au point un algorithme qui, à partir des données brutes de déplacement local, sélectionne les zones en progression, et les associe de proche en proche pour repérer l'ensemble de la protrusion. Une description plus complète figure en annexe E. Le résultat est intéressant, mais sur des données réelles, la présence de bruit sur la détection des contours nous complique la tâche. Il est alors nécessaire de rajouter différents tests et paramètres pour avoir une exactitude et une robustesse de détection, or le temps nous a manqué pour pousser cela à son terme. Nous nous sommes donc contentés dans la suite de cette étude d'une sélection manuelle de quelques trajectoires représentatives (section II.D).

II.D Détails des protrusions individuelles

La simple observation de la motilité d'*E. histolytica* (section I.C.3) montre une dynamique d'extension des pseudopodes très active, et des mesures préalables grossières font apparaître des vitesses de progression de plusieurs mi-

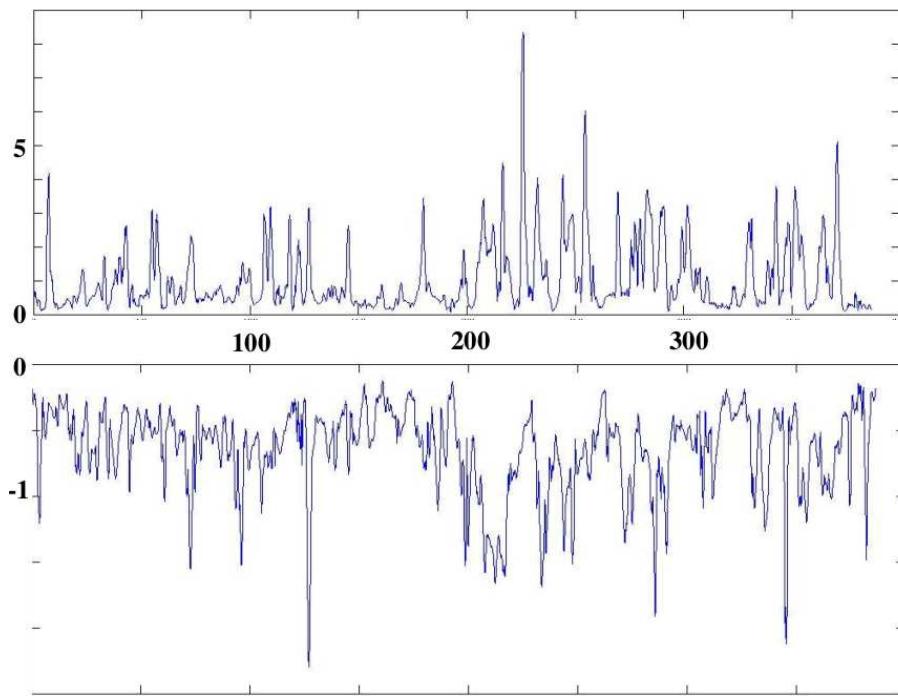


FIG. II.24: Reprise des données de la figure II.23 : en haut, maximum de vitesse protractrice le long du contour total (en μ m/sec), en fonction du temps (en secondes) ; en bas, valeur maximale de vitesse en rétraction le long du contour total, en μ m/sec (par convention : vitesses négatives). Les valeurs observées sont bien plus fortes et dispersées pour les protrusions, avec des pics réguliers à plusieurs μ m / sec ; *a contrario*, la vitesse maximale de rétraction connaît des fluctuations beaucoup plus faibles, autour de 0,5 μ m / sec en moyenne.

crons par seconde (par exemple les analyse de la figure II.24) ; aussi, il était intéressant de caractériser de façon plus précise et quantitative la dynamique de progression de pseudopodes individuels, ce qui fournira des indications précieuses sur les mécanismes physiques et moléculaires sous-jacents.

II.D.1 Mesure des vitesses d'avancée de front

La première étape consiste à sélectionner des événements de protrusion individuels (sélection en espace et en temps). Puis vient la phase de détection des contours : une difficulté d'analyse est que bon nombre de protrusions présentent des variations de contraste au cours de leur avancée ; aussi, nous avons utilisé une méthode de suivi par autocorrélation afin d'ajuster automatiquement la position du contour tout au long de la progression (voir en annexe B.2 pour le détail de la méthodologie).

Une fois les contours obtenus sur chaque image des séquences protractrices, il est possible de mesurer, pour chaque point du contour, sa vitesse de déplacement ; on peut en déduire la vitesse d'avancée du front de la protrusion au

cours du temps (figure II.25). Les mesures confirment la dynamique extrêmement rapide de l'expansion, avec des vitesses typiques d'expansion locale de $5 \mu\text{m/sec}$, pouvant atteindre transitoirement en début de protusion quelques dizaines de $\mu\text{m/sec}$. Cette expansion est plus rapide d'un ordre de grandeur au moins que les vitesses typiques de polymérisation d'actine¹⁵, et est une indication claire que la motilité n'est pas du type « extension frontale par polymérisation d'actine¹⁶ ».

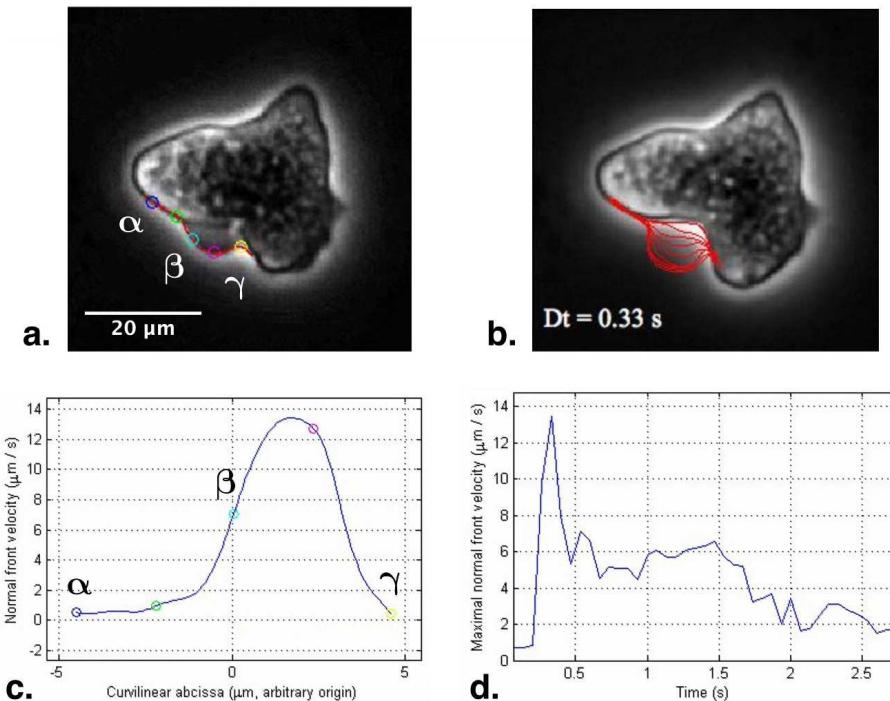


FIG. II.25: Analyse cinétique détaillée d'une protrusion. a). Détection du bord proéminent sur une image. b). Superposition de contours successifs (un toutes les 0,33 secondes) montrant l'expansion de la protrusion étudiée. L'image en superposition est la première image de contraste de phase de la séquence. c). Graphe montrant la mesure des vitesses locales à un instant donné. Les marques colorées correspondent aux indicateurs affichés sur l'image (a). d). Pour chaque image de la séquence, mesure du maximum de vitesse locale, ce qui permet de tracer la vitesse du front de la protrusion en fonction du temps. Nous voyons tout d'abord une augmentation brusque à $13 \mu\text{m/sec}$, suivie d'une expansion à une vitesse de l'ordre de 5 à $6 \mu\text{m/sec}$, progressivement amortie.

II.D.2 Mesure de la courbure locale des protrusions

Les protrusions naissantes présentent une forme assez régulière (de l'ordre de la portion de sphère ou de parabole), suggérant une forme due à un équilibre

¹⁵les vitesses typiques de polymérisation d'actine sont de quelques dizièmes de micron par seconde ([Pollard, 1986], [Theriot *et al.*, 1992]).

¹⁶modèle décrit en introduction section I.A.3.c.

de pressions simple de type loi de Laplace (figure II.26). Quelques inhomogénéités dynamiques sont visibles, qui peuvent provenir de la base géométrique de la protrusion, de forme géométrique non triviale à 3 dimensions.

II.D.3 Mouvement des organelles cytosoliques

Lors de la formation de la protrusion, on observe assez fréquemment qu'elle est initialement dépourvue de vésicules intracytoplasmiques, et que ce n'est qu'après plusieurs secondes que les organelles cytosoliques parviennent à envahir la protrusion ; ceci est visible en contraste de phase mais apparaît de façon bien plus frappante en microscopie à contraste interférentiel où la protrusion initiale peut apparaître d'une granularité vraiment distincte du reste de la cellule (figure II.27).

Les organelles cytoplasmiques sont d'une taille supérieure au micron, et leur mouvement brownien est donc négligeable devant les flux cytoplasmiques générés au cours de la migration ; comment expliquer le fait qu'ils n'envahissent parfois qu'avec retard l'intérieur des protrusions nouvellement formées ?

Réponses possibles :

- hypothèse 1 : les vésicules ne peuvent suivre le flux cytoplasmique qui envahit la protrusion car des obstacles les en empêchent.
 - hypothèse 1.1 : la forme des protrusions (initialement trop plates, par exemple), empêche les vésicules d'y pénétrer par simple effet stérique ; cependant, d'après la morphologie des protrusions (notamment figure I.24), les protrusions ont une base large, ce qui contredit cette hypothèse.
 - hypothèse 1.2 : la compartimentation de la cellule limite les mouvements des vésicules. On peut imaginer que des portions de cytosquelette limitent temporairement le mouvement des vésicules.
- hypothèse 2 : les protrusions sont initialement générées par un afflux de fluide externe, et donc à l'initiation des protrusions il n'y a pas de flux intracytoplasmique, ce qui expliquerait que les vésicules ne soient pas entraînées.

L'hypothèse 2 a comme corollaire une activation locale de canaux pour provoquer un influx¹⁷, or il est notable que les flux cytoplasmiques en direction de la zone de protrusion sont précoces (figure II.28), ce qui indique que le phénomène d'afflux de fluide externe n'est pas le moteur de la poursuite de la progression ; aussi, le plus probable est que ce soient des éléments de cytosquelette qui gênent le mouvement des vésicules, mais une réponse complète nécessitera un suivi fin de la dynamique du cytosquelette (ce que nous verrons à la section II.E).

¹⁷modèle de protrusion frontale par forces osmotiques décrit section I.A.3.b.

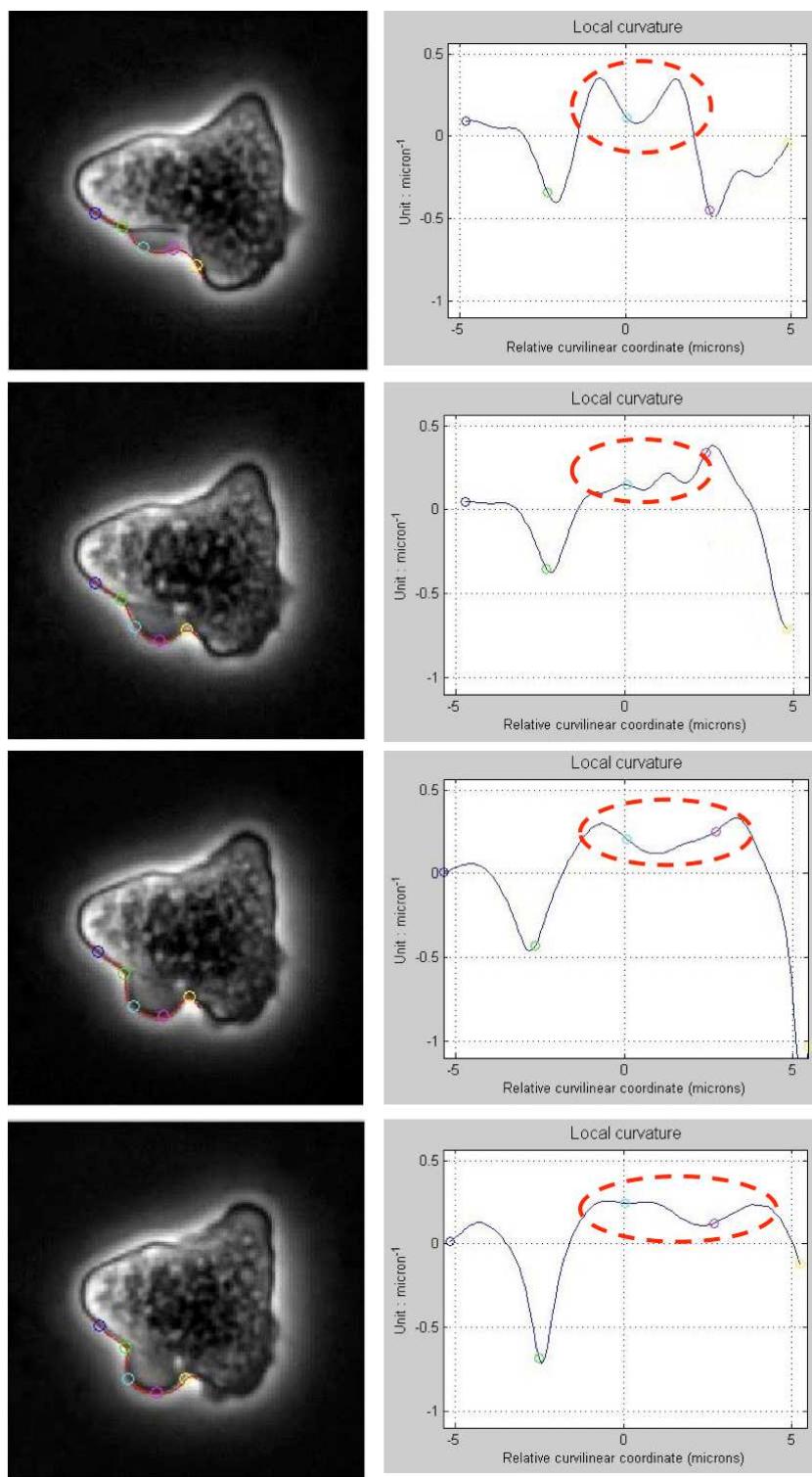


FIG. II.26: Mesures locales de la courbure à différents instants du développement d'une protrusion (même protrusion analysée que celle de la figure II.25 sur sa cinétique).

II.D.4 Détails du développement d'une protrusion

De ces observations et mesures, nous avons pu définir différentes étapes dans le développement d'une protrusion (voir en parallèle la figure II.29) :

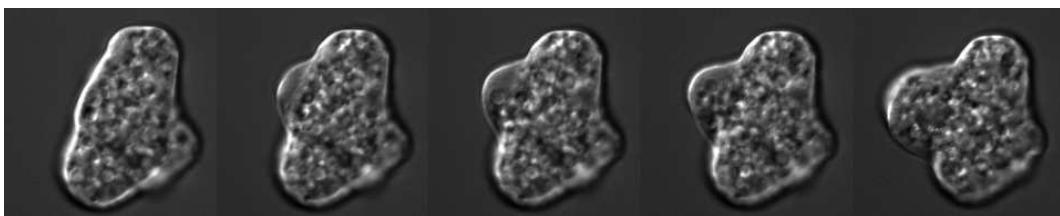


FIG. II.27: Développement d'une protrusion imagée en microscopie à contraste interférentiel. L'image 1 est prise juste avant le début de la protrusion ; sur l'image 2, la protrusion a déjà commencé à s'étendre mais elle n'est remplie que de cytosol, aucun organite interne ne l'a encore envahie ; sur l'image 3, on voit les organelles internes commencer à envahir la protrusion par sa partie inférieure ; la protrusion poursuit alors son développement tandis que les organelles se répartissent dedans de façon relativement uniforme.

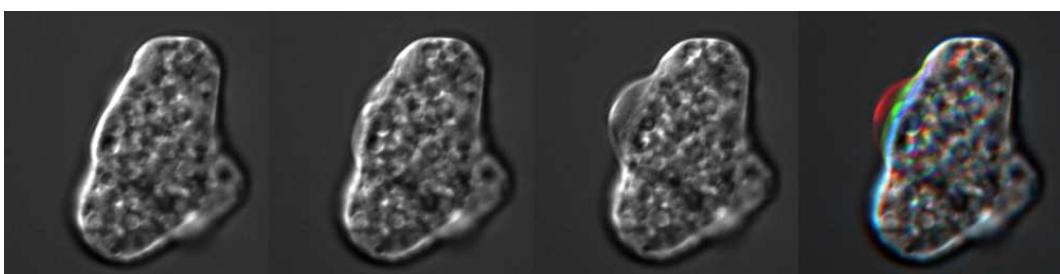


FIG. II.28: Montage illustrant la précocité des flux cytoplasmiques (repris de la protrusion illustrée figure II.27). On utilise 3 images correspondant au début du développement de la protrusion, avant l'envahissement de celle-ci par les organelles internes. L'image de droite représente un montage couleurs (une image par canal R, V, B) : les zones où il n'y a pas de déplacement sont donc grises uniformes, et les zones marquées par des déplacement d'objets montrent un dégradé bleu/vert/rouge. On note que même dans cette phase précoce du développement de la protrusion, les organelles internes montrent un déplacement en direction de la protrusion nouvellement formée.

1. une première phase rapide, durant quelques centaines de milli-secondes, avec des vitesses très élevées (jusqu'à quelques dizaines de $\mu\text{m/s}$). Ces événements apparaissent principalement si la zone de départ de la protrusion montre une courbure locale concave (dans le plan d'observation) ; considéré en 3D, la spécificité de ces emplacements est que les deux courbures principales sont de signe opposé, au lieu d'être toutes deux convexes pour la plupart de l'enveloppe cellulaire (exemple figure II.30).
2. une seconde phase, durant quelques secondes, caractérisée par un contraste différent (plus sombre) par rapport à la partie principale de la cellule, la réminiscence à la base de la protrusion de l'« ancien » contours, et/ou un retard des organelles intracellulaires à remplir la protrusion. Les vitesses typiques d'extension lors de cette phase sont de l'ordre de $5 \mu\text{m/s}$. La forme de la protrusion est grossièrement sphérique.
3. une troisième phase de « flot », avec des vitesses de protrusion tout

d'abord comparables à la phase précédente et décroissant au cours du temps, un contraste de la protrusion qui s'homogénéise par rapport à la partie cellulaire principale, et la disparition des contraintes sur le mouvement des organelles intracellulaires.

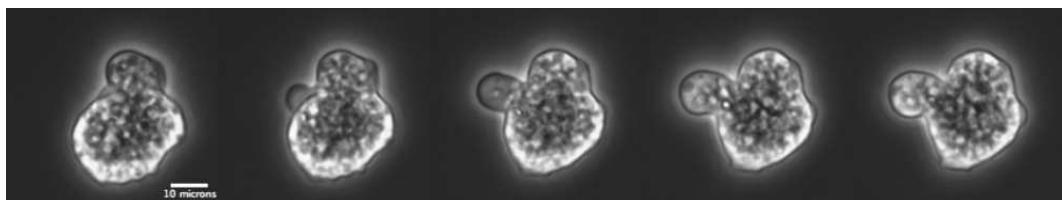


FIG. II.29: Exemple du développement d'une protrusion, imagée en contraste de phase (intervalle temporel entre images : 2 secondes). Initialement la protrusion apparaît avec un contraste sombre, dépourvue d'organelles internes, puis son contraste évolue progressivement, si bien qu'à la fin de l'expansion la protrusion est semblable au restant de la cellule.

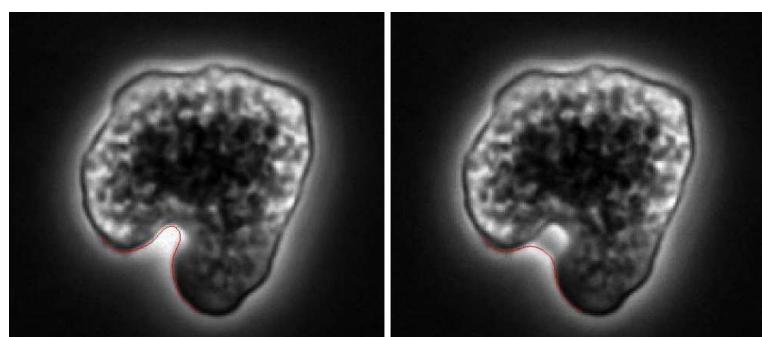


FIG. II.30: Exemple de déplacement membranaire particulièrement rapide (intervalle temporel entre ces 2 images : 1/15ème de seconde).

La délimitation de ces 3 étapes présente un peu d'arbitraire : ainsi la phase 1 n'est rien d'autre qu'une phase 2 avec une cinétique un peu exacerbée (de sorte que cette phase 1 est par nature « optionnelle ») ; et le passage phase 2 / phase 3 n'est pas tranché, mais continu. Il n'y a pas de régularité particulière qui émerge de l'analyse détaillée de la succession des protrusions ; on observe plutôt une génération assez chaotique, tantôt de plusieurs protrusions courtes, tantôt d'une protrusion longue. Un exemple est donné figure II.31.

On peut néanmoins faire une analyse statistique grossière pour estimer l'importance des phases 1 et 2 par rapport à la phase 3 :

- par rapport à l'ensemble des protrusions, jusqu'à 70% incluent¹⁸ une des deux phases 1 / 2.

¹⁸ce pourcentage est un plancher : il est probable que pour certains événements, les phases précoces 1 ou 2 sont masquées pour des raisons géométriques - une protrusion qui démarre vers le haut, par exemple.

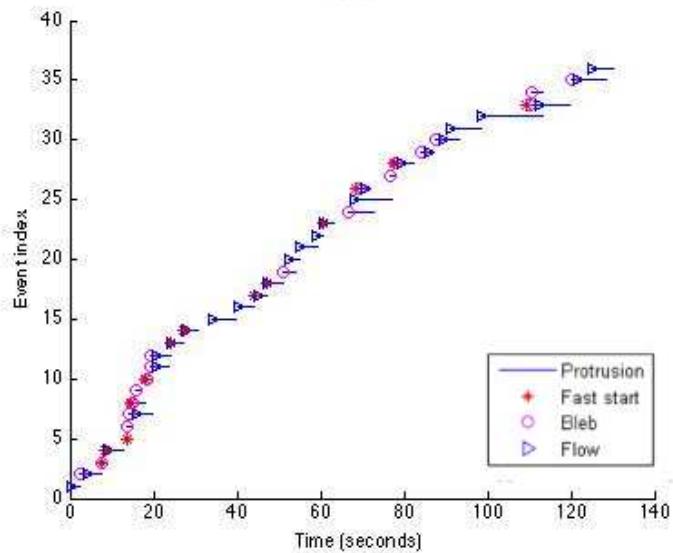


FIG. II.31: Graphe représentant les protrusions successives au cours du temps pour une trajectoire cellulaire. Chaque protrusion est représentée par une barre bleue dont la longueur correspond à sa durée, et chacune se voit attribuer un numéro qui permet un placement différentiel en ordonnée et évite un affichage superposé de protrusions différentes. Des symboles permettent de distinguer les différentes étapes cinétiques internes à chaque protrusion (fast start = étape 1, bleb = étape 2, flow = étape 3).

- parmi ces protrusions démarrant par une phase 1 / 2, une part notable (50 à 75 %) ne donnent pas naissance à une protrusion incluant la phase 3 (cf. statistiques détaillées en annexe G). Une cause pourrait être le remodelage morphologique constant de la cellule, la variabilité morphologique entraînant alors cette variabilité de protrusions. En d'autres termes, pour satisfaire à des conditions de motilité aléatoire, il faut contrôler que les protrusions soient limitées en durée donc en extension ; de la sorte, pour s'assurer qu'aucune protrusion n'aboutisse à une polarisation définitive spontanée de la cellule, malgré une variabilité des conditions initiales de développement des protrusions, il est probable qu'il faille être dans des conditions d'« inefficacité » protrusive partielle (= absence de phase 3 pour une partie des protrusions).

Nous nous sommes également demandé quelle était l'importance relative des différentes phases sur le déplacement cellulaire : une conclusion d'analyses non détaillées ici¹⁹ est que les phases de type 3 représentent la contribution principale de l'activité motrice pour le déplacement de la cellule. Les phases 1 et 2 ont généralement un poids faible en tant que tel, mais sont néanmoins cruciales car elles sont, dans une majorité de cas, à l'origine de la 3ème étape.

¹⁹ces analyses montrent que la vitesse de déplacement du centre géométrique est assez comparable lors des 3 phases, mais que les phases 3 sont dominantes en terme de répartition temporelle : ce sont donc elles qui sont dominantes en terme d'effet sur le déplacement cellulaire.

Une autre question, que nous avons déjà abordée, est de déterminer si l'extension d'une protrusion résulte d'une force purement locale ou globale. En d'autres termes, les protrusions sont-elles indépendantes ou non ? Un élément de réponse est de considérer l'histogramme du nombre de protrusions au cours du temps : si les protrusions sont fréquentes et indépendantes, on s'attend à observer assez fréquemment des chevauchements entre protrusions ; à l'inverse, si les protrusions sont négativement corrélées, on s'attend à observer la plupart du temps une unique protrusion (ou aucune), avec un histogramme biaisé par rapport à des simulations dans lesquelles la probabilité d'occurrence de protrusions n'est pas interdépendante. Les analyses sont détaillées figure II.32 : la conclusion est que la génération des protrusions n'est pas indépendante et donc qu'un processus de contrôle à l'échelle de la cellule est à l'oeuvre.

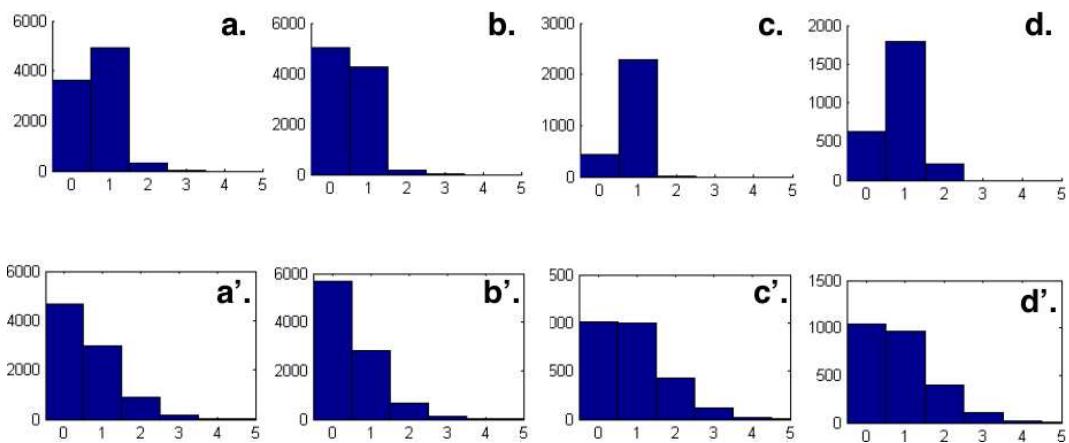


FIG. II.32: Distributions du nombre de protrusions à chaque instant. Graphes a/b/c/d : exemples sur des trajectoires réelles. La plupart du temps une seule protrusion se développe à la fois ; le rapport entre temps avec 0 protrusion et temps avec 1 protrusion varie selon les cellules considérées, en fonction de leur activité intrinsèque. Graphes a'/b'/c'/d' : pour chaque trajectoire réelle (resp. a' pour a ; b' pour b ; ...), on montre la distribution du nombre de protrusions pour des simulations où les protrusions seraient complètement indépendantes : les simulations montrent un chevauchement plus fréquent entre protrusions qui se traduit par une proportion plus importante d'observations de 2, 3... protrusions simultanées. La conclusion est que le mécanisme de génération des protrusions implique une régulation globale, qui entraîne en général le développement d'une seule protrusion à la fois.

II.D.5 Conclusions

Les vitesses mesurées, passablement plus élevées que les vitesses de polymérisation d'actine, suggèrent que le « moteur » de l'avancée des protrusions n'est pas une poussée directe par polymérisation corticale. Un candidat intéressant, du fait des flux cytoplasmiques observés lors de l'expansion des protrusions, est une pression hydrostatique interne générée par l'activité contractile du cortex d'acto-myosines.

Le contraste et l'homogénéité de courbure initiaux, associés à la rapidité du départ des protrusion et au mouvement retardé des organelles cytosoliques, suggèrent un mécanisme de disjonction de la membrane par rapport au cytosquelette.

On est donc en présence d'une instabilité dynamique, qui permet de générer plus ou moins régulièrement de nouvelles protrusions, mais avec la caractéristique intéressante de ne pas entraîner une polarisation définitive de la cellule sur l'axe de cette protrusion.

II.E Dynamique du cytosquelette lors de l'expansion des protrusions

Une étape-clé pour comprendre le mécanisme de génération et d'expansion des protrusions est d'expliquer le rôle du cytosquelette d'actine au cours de cette expansion. Mais ceci comporte un certain nombre de difficultés, car l'évolution des protrusion est très rapide : il nous faut pouvoir distinguer des sous-étapes précises au cours d'un mécanisme qui dure moins d'une dizaine de secondes... Nous avons essayé certaines approches par fixation de cellules (sections II.E.1.a et II.E.1.b), et d'autres par marquages du cytosquelette sur des cellules vivantes (sections II.E.1.c, II.E.1.d, II.E.1.e et II.E.1.f).

II.E.1 Essais divers de visualisation du cytosquelette...

II.E.1.a Fixation chimique

Une méthode usuelle pour visualiser la localisation d'une structure cellulaire est de « fixer » la cellule via des composés chimiques, ce qui permet ensuite d'utiliser des anticorps couplés à un marqueur fluorescent. Sur le papier, cette méthode pourrait permettre d'obtenir, sur une population cellulaire, des instantanés de protrusions à différents stades de leur développement, pour ensuite reconstituer par recouplement le déroulement temporel typique d'une phase protrusive. Or par cette méthode aucun travail précédent n'a pu ni décrire le déroulement cinétique précis du développement d'une protrusion comme nous l'avons décrit section II.D.4, ni apporter des éléments d'explication des différentes phases cinétiques observées. Les tests que nous avons pu faire ont mis en évidence des artefacts de fixation par rapport au comportement motile des cellules : en l'occurrence, les cellules ne se trouvent pas fixées dans un état reproduisant l'extension d'une protrusion (figure II.33) : le défaut principal semble être le temps d'action du fixateur, de l'ordre de quelques secondes, ce qui est donc comparable au temps de développement d'une protrusion ; ainsi la fixation interfère avec la dynamique protrusive, et donc l'état de la cellule « fixée » est le résultat de ce compromis cinétique. Des tests avec des conditions

de fixation plus stringentes (non montré ici) n'ont pas donné de résultats plus probants.

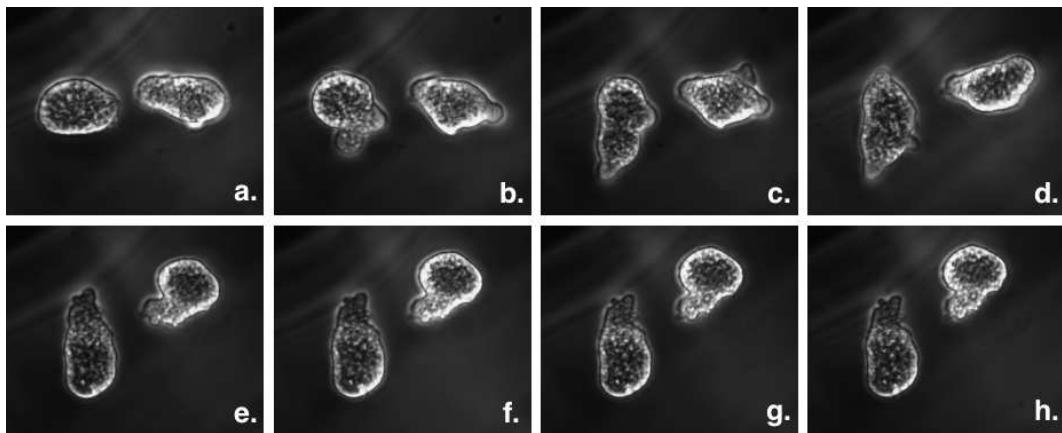


FIG. II.33: Fixation chimique au paraformaldhéhyde suivie en direct (intervalle temporel entre images : 5 secondes). Sur les images a. à c., les cellules ont encore un mouvement normal. La fixation opère aux images d. et e. Sur les images f. et suivantes, les cellules sont fixées, mais leur morphologie est en partie artefactuelle.

II.E.1.b Cryo-microscopie à haute pression

La microscopie électronique présente l'avantage sur la microscopie optique d'atteindre une résolution bien supérieure, et par là même d'identifier des structures fines comme le cortex sans nécessité d'un marquage spécifique. Cependant, les échantillons doivent être observés sous vide, et la profondeur de pénétration d'un faisceau d'électrons est faible (quelques centaines de nanomètres), ce qui impose une préparation dédiée : la solution classique est l'enrobage de l'échantillon dans une résine plastique puis sa découpe en tranches fines (de l'ordre de 50 à 200 nm) par une machine spéciale (ultramicrotome). Les techniques conventionnelles de fixation (par exemple glutaraldéhyde), qui procèdent par diffusion du composé actif et pontages, présentent les artefacts habituels vu en microscopie optique (évoqués au paragraphe précédent II.E.1.a), et de plus sont spécifiques (ainsi le glutaraldéhyde ne réagit qu'avec certains résidus d'acides aminés et ne fixera donc pas les acides nucléiques ou des molécules de type carbohydrates) : lors de la déshydratation qui accompagne l'enrobage en résine, les constituants non fixés vont donc disparaître lors des rinçages successifs, donnant lieu à des artefacts de fixation.

Pour pallier ces défauts des méthodes de fixation chimique usuelles, des techniques de fixation par refroidissement rapide ont été développées, qui permettent d'immobiliser tous les constituants cellulaires en moins de quelques millisecondes ; pour éviter la formation de cristaux de glace, la meilleure solution est un refroidissement à haute pression qui laissera la glace dans un état non-cristallisé (vitreux) ; la fixation proprement dite (par déshydratation)

a lieu dans une phase ultérieure, lors de la substitution progressive de l'eau par un solvant organique. La technique de cryo-microscopie à haute pression a fait ses preuves et permet des avancées notables en terme d'amélioration de résolution et de réduction d'artefacts de fixation ([McDonald and Auer, 2006]). Néanmoins elle est complexe à mettre en oeuvre et peu de laboratoires dans le monde maîtrisent à ce jour cette technique.

Nous avons donc tiré parti de la proximité de l'équipe de Sergio Marco (Institut Curie, Orsay) pour faire des tests avec les amibes. L'idée principale était de tester les capacités de cette technique pour obtenir des clichés instantanés de protrusions en cours de développement qui ne soient pas affectés par les artefacts liés à la fixation chimique décrits section II.E.1.a. Malheureusement, aucun protocole de cryofixation validé pour les amibes n'a été décrit à ce jour ; nous avons donc fait quelques tests préliminaires (figure II.34) avec un protocole standard, qui n'a pas donné de résultats exploitables ; la mise au point d'un protocole efficace aurait nécessité des mois de travail de mise au point, et nous n'avons donc pas poursuivi les tests en regard de l'objectif principal de la thèse.

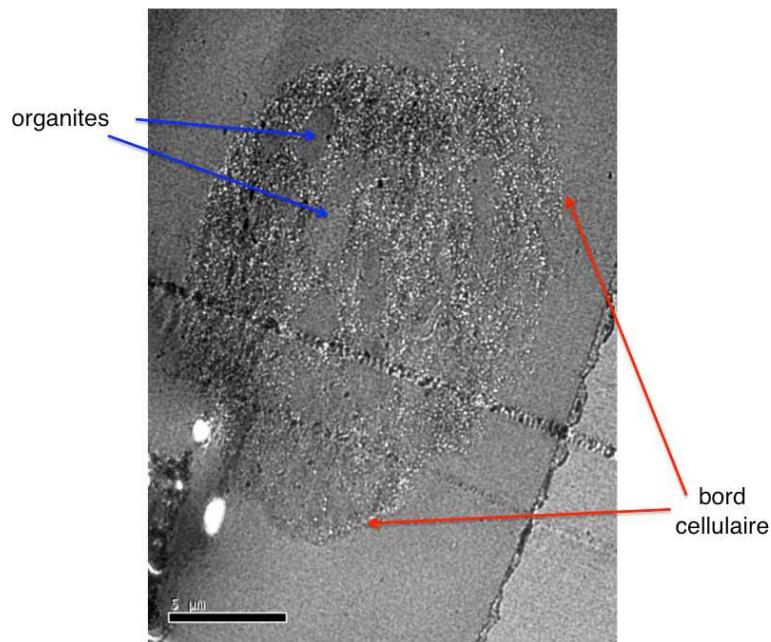


FIG. II.34: Cliché de microscopie électronique, échantillon fixé par cryo-fixation.

II.E.1.c Actine GFP

Nos collègues de l'institut Pasteur (équipe Nancy Guillen) ont développé un plasmide pour permettre l'expression d'une actine-GFP, mais après transfection du plasmide aucune expression de la protéine-GFP n'a été constatée. Les raisons de cet échec sont inconnues, une piste probable est que le système

de régulation de l'expression génique soit relativement complexe chez l'amibe (des travaux récents montrent ainsi une variation de l'haploïdie de l'amibe en fonction des conditions de culture...).

II.E.1.d Marquage phalloïdine

La phalloïdine est un composé extrait de l'Amanite phalloïde, qui se lie aux filaments d'actine et empêche leur dépolymérisation. La phalloïdine marquée, utilisée à faible concentration, peut être utilisée comme marqueur de l'actine polymérisée sur cellules vivantes ; cependant, un point critique est d'être à concentration en drogue suffisamment faible pour ne pas perturber de façon trop notable la dynamique de l'actine et donc la motilité. Ainsi, sur le kératocyte chez qui cette technique a été essayée, les concentrations utilisables sont trop faibles pour permettre une utilisation en épifluorescence, mais ont été utilisées en microscopie à fluorescence de speckle ([Vallotton *et al.*, 2005]). La phalloïdine marquée n'étant pas membrane-perméante, nous avons utilisé de la digitonine pour perméabiliser la membrane durant les quelques minutes d'incubation avec la phalloïdine-TRITC. La conclusion de ces tests, illustrés figure II.35, est la suivante : la concentration de phalloïdine nécessaire pour obtenir un marquage observable n'est pas compatible avec la dynamique de protrusion.

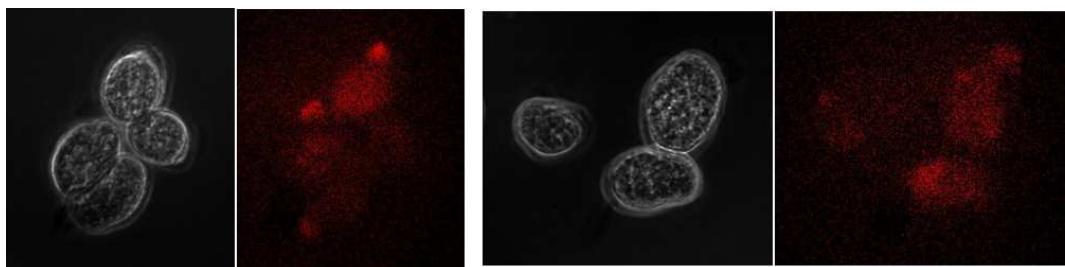


FIG. II.35: Exemples de marquages phalloïdine-TRITC (50 nM) : le marquage est présent, mais trop faible (diffus), et malgré cela la motilité cellulaire est déjà fortement réduite et ne reproduit plus des conditions physiologiques. Pour une concentration réduite de 10x en phalloïdine, la motilité est normale mais le marquage quasi-inexistant.

II.E.1.e Tests de microinjection de peptide LifeAct

Un marqueur de l'actine filamentuse bien plus physiologique que la phalloïdine marquée est le peptide LifeAct conjugué à un fluorophore ([Riedl *et al.*, 2008]). Nous avions commencé par tenter de faire exprimer ce peptide directement par les amibes, mais des problèmes de transfection nous ont conduit à tester une voie parallèle : injecter directement un peptide déjà synthétisé dans les cellules. Une difficulté expérimentale est que la membrane plasmique n'est pas perméable au couple peptide-fluorophore : nous ne disposions que de faible

quantités de peptides, et donc une électroporation standard sur une population complète (comme décrit pour *Dictyostelium* dans [Yumura *et al.*, 1995], [Yumura, 1996] ou [Yumura and Fukui, 1998]) était exclue. Une alternative est alors une injection localisée sur cellules individuelles ; la microinjection étant connue pour ne pas donner de bons résultats sur *E. histolytica*, nous avons testé une technique d'électroporation locale via une micropipette : l'appareil utilisé a été un Axoporator 800A prêté par l'équipe d'Isabel Llano (Université Paris 5, laboratoire de Physiologie Cérébrale), et un schéma de son principe de fonctionnement est détaillé au chapitre suivant, figure III.10.

Cette technique d'électroporation locale, couramment utilisée sur des neurones ([Kitamura *et al.*, 2008]), s'est avérée complexe à adapter à *E. histolytica* : une première difficulté est que les amibes sont micro-aérobies et donc il est nécessaire d'isoler l'échantillon de l'oxygène ambiant, ce qui impose des contraintes expérimentales fortes ; en l'occurrence, nous sommes contraints d'isoler l'échantillon entre 2 lamelles de verre et d'utiliser des embouts de pipettes « longs » (>8 mm) pour y avoir accès, alors que les embouts de pipettes de patch usuelles sont beaucoup plus courts (<4 mm) ; en conséquence, pour conserver une résistance de pipette dans la gamme de l'appareil, l'embout de la pipette que nous utilisons est beaucoup plus large ($5 \mu\text{m}$ versus $1 \mu\text{m}$), ce qui fait que pour avoir un contact électrique suffisant avec la cellule, la pression à l'intérieur de la pipette doit être moyennement négative (au lieu de légèrement positive en temps normal). Ceci est un problème important car le composé à injecter est dans la pipette (uniquement) et donc toute entrée de fluide dans la pipette le rejette à l'intérieur, suite à quoi il faut attendre qu'il se retrouve en concentration suffisante à l'embout de la pipette par diffusion. Or, parallèlement, les cellules observées sont très motiles : le contact électrique obtenu est donc transitoire, du fait simple que la cellule, en se déplaçant, s'extrait de la pipette.

Une solution envisagée aurait pu être de jouer sur la température de l'échantillon : dans un premier temps, refroidir pour fortement limiter la motilité des cellules et pouvoir ainsi électroporer des cellules inertes ; puis remonter la température pour observer le résultat du marquage en conditions physiologiques. Mais comme parallèlement l'expression par plasmide de peptide-GFP a pu être obtenue (section suivante II.E.1.f), nous avons abandonné ce protocole.

II.E.1.f Principe du plasmide LifeAct GFP

Pour l'imagerie de la dynamique du cytosquelette d'actine au cours des événements de protrusion, nous avons donc utilisé un marquage via le peptide Lifeact ([Riedl *et al.*, 2008]) fusionné à la GFP (détails en annexe H). Les résultats qualitatifs et quantitatifs sont détaillés en section II.E.2.

II.E.2 Résultats

II.E.2.a L'élément initiateur de la protrusion est un détachement de la membrane

L'observation d'une protrusion, à la fois en contraste de phase (pour avoir la morphologie cellulaire d'ensemble) et en fluorescence (visualisation du cytosquelette marqué par LifeAct-GFP) est détaillée figure II.36 ; l'observation montre que la protrusion est formée par la projection d'une portion de membrane qui se détache du cytosquelette ; nous sommes donc en présence d'une motilité par blebs ([Fackler and Grosse, 2008], [Charras and Paluch, 2008]) ; le cycle complet comporte :

1. le détachement de la membrane de son cytosquelette, puis la progression de la membrane.
2. en parallèle : la dépolymérisation du cortex resté à la base de la protrusion (en effet il est privé de son renouvellement naturel par polymérisation puisque ce renouvellement n'est activé qu'en présence de membrane) et la polymérisation d'un nouveau cortex sur la membrane nue projetée.
3. *in fine*, le cortex basal a disparu et un nouveau cortex d'actine s'est reformé sur la membrane projetée.

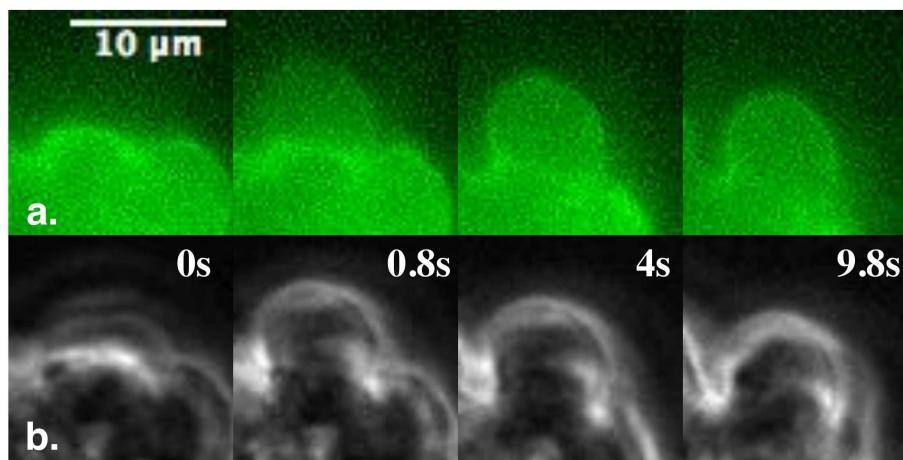


FIG. II.36: Visualisation du cortex d'acto-myosines durant un événement protruif, en épifluorescence. a). Marquage F-actine (lifeAct-GFP, acquisition : 2x60 ms). b). Image en contraste de phase (acquisition : 60 ms). Une seconde après le démarrage de la protrusion, le cortex basal est toujours présent, tandis qu'il n'y a pas de marquage cortical sur la membrane de la protrusion en expansion. Le cortex basal dépolymérise par la suite, tandis qu'un nouveau cortex se reforme sur la membrane de la protrusion.

II.E.2.b Quantification

Nous avons procédé à une analyse un peu plus quantitative de ces données obtenues en fluorescence. Il en ressort que la repolymérisation du nouveau

cortex est rapide (renforcement cortical visible en fluorescence en quelques secondes, le niveau stationnaire étant atteint en environ 5 secondes, graphe f. figure II.37) ; la décroissance de fluorescence à l'emplacement du cortex basal (graphe d. figure II.37) est elle plus délicate à interpréter puisqu'elle inclut deux phénomènes : 1/ augmentation du fond de fluorescence lors du développement de la protrusion (du fait que l'emplacement observé était initialement au bord de la cellule, donc peu affecté par la fluorescence non-spécifique et la fluorescence spécifique hors focus, et se retrouve ensuite à l'intérieur de la cellule) ; 2/ dépolymérisation du cortex basal (qui se traduit par l'uniformisation du niveau de fluorescence en lieu et place d'une structure corticale bien définie). La décroissance étant perceptible sur 10 secondes, il semble que l'échelle de temps caractéristique pour ce phénomène soit la dizaine de secondes.

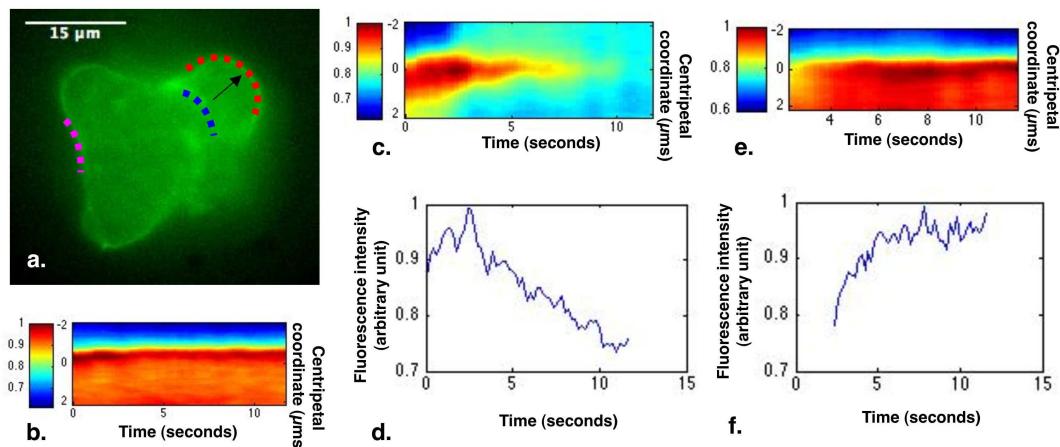


FIG. II.37: Analyse de la dynamique du cortex d'actine durant une protrusion. a). Schéma décrivant le principe d'analyse : nous faisons le suivi de l'intensité de fluorescence pour : un contour de « référence » stable (rose), pour le cortex à la base de la protrusion (bleu) et pour le cortex nouvellement formé (rouge). b). Profil d'intensité de fluorescence sur la normale au cortex, le long du contour de référence, au cours du temps. Les profils le long du contour de référence sont moyennés, afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. Un marquage cortical constant est visible. c). Profil d'intensité de fluorescence sur la normale au cortex basal, au cours du temps. Le marquage cortical disparaît progressivement après la disjonction de la membrane. d). Intensité de fluorescence du cortex basal au cours du temps. Le marquage a complètement disparu 10 secondes après l'apparition de la protrusion. e). Profil d'intensité de fluorescence sur la normale au contour de la protrusion, au cours du temps. Initialement il n'y a pas de marquage cortical visible, mais en quelques secondes un cortex se forme. f). Intensité de fluorescence du néo-cortex au cours du temps.

II.F Modèle

II.F.1 Ce que le modèle devra pouvoir expliquer

Le modèle à mettre en place devra pouvoir expliquer les observations faites dans les sections précédentes de ce chapitre :

1. initiation des protrusions via une disjonction de la membrane par rapport au cytosquelette (section II.E), ce qui se traduit par une forme initiale déterminée par la loi de Laplace et donc une régularité de courbure (cf. section II.D.2).
2. tout indique que le moteur d'expansion des protrusions est une pression hydrostatique interne (section II.D.3), d'où une dépendance bien moindre de la motilité par rapport au substrat qu'une motilité de type kératocyte (section II.B).
3. les vitesses typiques observées sont de l'ordre de quelques microns par seconde (section II.D.1).
4. évolution rapide entre différentes sous-étapes protrusives (décrisées section II.D.4).
5. absence de directionnalité persistante : les protrusions finissent par se stabiliser, et le mouvement se poursuit par l'apparition d'une nouvelle protrusion distincte de la précédente, dans une direction non corrélée (section II.C et plus particulièrement la figure II.19).
6. la contractilité du cytosquelette joue un rôle moteur (cf. mutant dominant négatif myosines : [Arhets *et al.*, 1998]).
7. l'instabilité intègre un contrôle cinétique global qui favorise la présence d'une seule protrusion à la fois (figure II.32).

II.F.2 Modélisation des propriétés mécaniques de la cellule

II.F.2.a Notations

Commençons par lister brièvement les différents paramètres que nous utiliserons par la suite pour modéliser les propriétés mécaniques de la cellule²⁰ :

- κ : le module élastique de la membrane.
- γ : la tension membranaire.
- ρ_b : densité de liens cytosquelette-membrane.
- f : la pression à laquelle sont soumis les liens entre le cytosquelette et la membrane.

²⁰les notations suivent autant que possible celles utilisées dans [Brugues, 2008].

- f^* : la pression critique à laquelle il y a disjonction cytosquelette-membrane.
- τ^* : le temps de relaxation effectif du cortex.
- γ_m : la tension corticale due à l'activité contractile des myosines.
- η_c la viscosité du cytosol.

Les liens entre le cytosquelette et la membrane (cf. introduction section I.B.2.b) sont soumis à une pression f et ont individuellement une résistance finie : une conclusion de [Brugues, 2008] est que la dynamique d'association/dissociation des liens cytosquelette-membrane est plusieurs ordres de grandeur plus rapide que le temps requis pour avoir une corrélation spatiale entre liens proches ; en d'autres termes, la pression f est partagée par les liens, mais la rupture d'un lien n'a pas d'incidence sur ses voisins immédiats car la dynamique d'association/dissociation est beaucoup plus rapide que la propagation de la contrainte²¹. En conséquence, en deçà d'une pression critique de disjonction f^* , l'adhésion cytosquelette-membrane est stable, mais dès que ce seuil f^* est atteint, il y a une transition brusque vers un détachement de la membrane. La valeur de f^* dépend elle-même à la fois de la densité de liens disponibles ρ_b , et de la densité de points d'attachement au cortex (donc de la densité corticale). En toute rigueur ces valeurs sont définies localement : $\rho_b(\vec{r})$ et $f^*(\rho_b(\vec{r}))$.

En ce qui concerne le cortex, le plus simple est de considérer un modèle de Maxwell avec un temps de relaxation τ (comportement élastique à temps $< \tau$, visqueux à temps $> \tau$) ; ici, l'origine microscopique de ce temps de relaxation est la cinétique des protéines de liaison internes au cytosquelette (cf. section I.B.1.a), qui s'attachent et se détachent des filaments d'actine, relaxant de façon continue toute tension accumulée entre les filaments. La particularité d'un gel d'actine est qu'il se renouvelle en permanence, pour tenir compte de cet effet on considère donc un temps de relaxation effectif τ^* qui intègre à la fois les effets viscoélastiques et de polymérisation/dépolymérisation. La présence de myosines ajoute un stress compressif actif σ_m , qu'on peut écrire sous forme de tension corticale γ_m (si le cortex est d'épaisseur h uniforme constante - épaisseur fixée par la vitesse de renouvellement du cortex, $\gamma_m = \sigma_m h$).

A l'équilibre statique, la seule contribution à la pression f exercée sur les liens cytosquelette-membrane vient de la tension γ_m due aux myosines, d'où $f = 2\frac{\gamma_m}{R}$ (avec R le rayon de courbure locale, cf. schéma II.38).

II.F.2.b Modèle

Nous proposons donc le modèle de protrusion suivant (figure II.39) :

- l'action des myosines crée un stress σ_m , ce qui augmente progressivement la contrainte f sur la jonction cytosquelette-membrane.

²¹ceci n'est plus valable dès que l'on considère des portions de membrane détachées suffisamment larges, pour lesquelles les liens centraux ne peuvent plus se reformer dès que la membrane est poussée en avant.

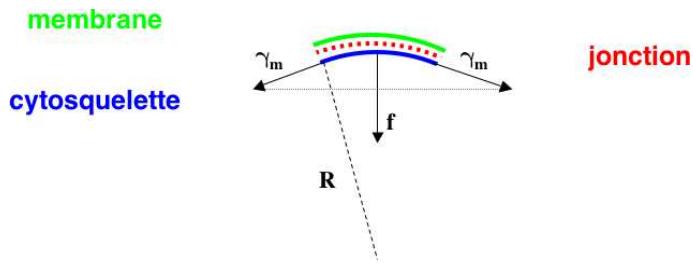


FIG. II.38:

- si $f_\infty < f^*$, le stress accumulé est insuffisant pour provoquer des disjonctions, et l'on n'observe pas de blebs. Mais si f est en mesure d'atteindre f^* , une disjonction se produit, à un endroit où la densité de liens est la plus faible si un tel endroit existe, à défaut (cas hypothétique d'une cellule avec résistance du lien membrane-cytosquelette parfaitement homogène) il y aura rupture quelque part par brisure de symétrie.
- la valeur de f , qui n'est plus définie que sur les zones encore attachées, décroît brusquement au moment du détachement. L'activité des myosines continue, ce qui permet de pousser un flux de cytosol dans la nouvelle protrusion et provoque son expansion ; dans un premier temps, la présence de cytoquelette à la base de la protrusion empêche les grosses vésicules intra-cytoplasmiques de pénétrer dans la protrusion (la taille de maille du cytosquelette étant submicronique), ce qu'elles finissent par faire une fois le cytosquelette dépolymérisé à la base de la protrusion (échelle de temps de quelques secondes).
- la protrusion continue tant que :
 1. le cortex « principal » est capable de poursuivre sa contraction, la contrainte résultante étant relaxée par un flux cytoplasmique dans la protrusion.
 2. le nouveau cortex qui se reforme progressivement dans la nouvelle protrusion n'est pas mécaniquement résistant par rapport au cortex principal.
- on a alors ré-augmentation de f jusqu'à la prochaine disjonction : cf. figure II.40.
- on se retrouve ainsi ramené aux points précédents 1 ou 2.

II.F.2.c Ordres de grandeur des paramètres du modèle

Un paramètre important de la dynamique est donc la pression critique de disjonction f^* ; il est difficile d'en donner *a priori* un ordre de grandeur pour notre modèle, vu que cela supposerait de connaître :

- quelles sont les molécules de liaison impliquées.
- quelle est leur densité.
- quelle est la force de rupture par lien.

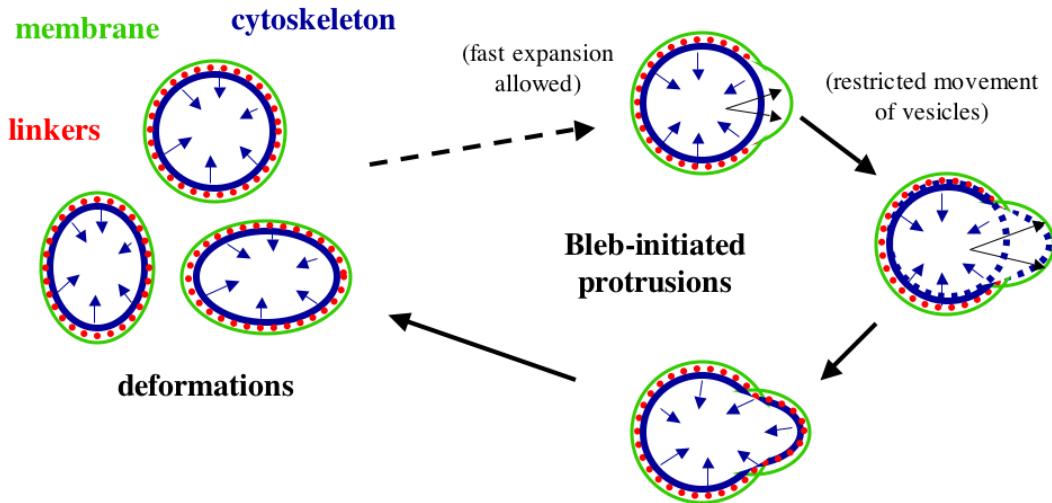


FIG. II.39: Schéma explicatif du cycle protrusif d'*E. histolytica*.

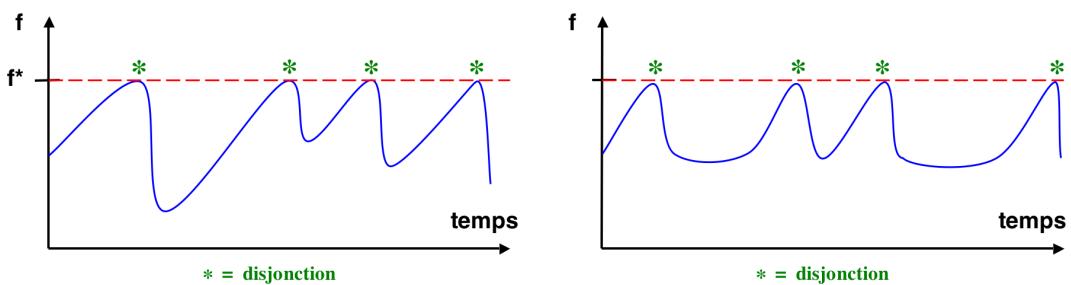


FIG. II.40: Hypothèses sur l'évolution de la pression f au cours du temps et des blebs successifs. Le cas réel inclus probablement un mélange des cas a. et b. a. Cas où selon la morphologie de disjonction, la relaxation de pression est plus ou moins grande, mais l'accumulation de pression ultérieure se fait à un rythme toujours similaire. b. Cas où toutes les disjonctions entraînent une relaxation de pression du même ordre, mais selon l'expansion de la protrusion le temps avant réaccumulation effective de stress est variable.

On peut toutefois estimer qu'un ordre de grandeur préliminaire raisonnable est de l'ordre de quelques centaines à quelques milliers de Pa (cf. tableau II.1), ce qui d'ailleurs est du même ordre que les mesures faites chez *Dictyostelium* par [Merkel *et al.*, 2000] ou chez les carcinosarcomes Walker par [Rentsch and Keller, 2000].

Intéressons-nous à présent aux valeurs typiques atteintes par la pression f exercée sur les liens cytosquelette-membrane : si l'on considère par exemple comme ordre de grandeur de la tension corticale γ_m due à l'activité des myosines une valeur de $5 \cdot 10^{-3}$ N/m ([Brugues, 2008]), cela conduit à des pressions

²²les ordres de grandeur moléculaires typiques de résistance de liaison sont de quelques kT , soit la dizaine de pN voire la centaine pour le couple streptavidine-biotine ([Merkel *et al.*, 1999]) ; [Brugues, 2008] estime à 16 pN la résistance des liens chez *Dictyostelium*.

Force de rupture ²² par lien	Densité de liens	f^* ($nN/\mu m^2$)	f^* (Pa)
5 pN	10 liens / μm^2	0,05 nN/ μm^2	50 Pa
50 pN	10 liens / μm^2	0,5 nN/ μm^2	500 Pa
5 pN	100 liens / μm^2	0,5 nN/ μm^2	500 Pa
50 pN	100 liens / μm^2	5 nN/ μm^2	5000 Pa

TAB. II.1: Ordres de grandeur pour f^* selon la densité et la résistance individuelle des liens.

f de l'ordre de quelques centaines à quelques milliers²³ de Pa, et peut donc permettre d'atteindre des valeurs similaires à celles discutées préalablement pour la pression critique de disjonction f^* .

Un autre paramètre important du modèle est le temps de relaxation effectif du cortex, τ^* , qui intègre à la fois les effets de cinétique des protéines de liaison du cortex, et son renouvellement par polymérisation/dépolymérisation. Dans d'autres systèmes, le temps de relaxation lié à la cinétique des protéines de liaison a été mesuré à des valeurs de l'ordre de la dizaine de secondes ([Wachsstock *et al.*, 1994], [Wottawah *et al.*, 2005]) ; bien sûr, ces mesures ne sont là qu'à titre indicatif, puisque la cinétique des protéines de liaison du cortex est susceptible de dépendre très fortement du type cellulaire considéré, et nous ne disposons pas de mesures pour *E. histolytica*. Signalons également que considérer pour le cortex un temps de relaxation unique ne peut être qu'une approximation, et qu'une approche plus exacte devrait considérer que le cortex est une structure complexe, avec des temps caractéristiques multiples (voir notamment [Balland *et al.*, 2006]), mais par simplicité nous nous bornons ici à une approche via un modèle de Maxwell. Quoi qu'il en soit, ce temps de relaxation est également borné par la dynamique de renouvellement de l'actine, qui dans notre système est rapide - de l'ordre de la dizaine de seconde (cf. section II.E.2), nous considérerons donc pour notre système que $\tau^* \simeq 10$ sec.

II.F.3 Compatibilité du modèle avec les observations

Discutons à présent la compatibilité du modèle II.F.2 avec les différents points décrits section II.F.1.

Les points II.F.1.1 (initiation par disjonction) et II.F.1.6 (rôle de la contractilité du cortex) sont constitutifs du modèle, et le point II.F.1.2 (expansion via pression hydrostatique interne) en découle naturellement ; la valeur des vitesses observées (point II.F.1.3) résulte alors d'un compromis entre la force fournie par la contraction du cortex et la résistance visqueuse à l'expansion de la protrusion, ces processus n'étant pas limités par une vitesse de polymérisation.

²³comme $f = 2\frac{\gamma_m}{R}$, en prenant $R = 10 \mu m$ et $\gamma_m = 5.10^{-3} N/m$, on obtient $f = 1000$ Pa.

Le point II.F.1.4 (évolution temporelle rapide) s'explique par la valeur relativement faible de τ^* dans notre système, qui permet un effondrement et une repolymérisation du cortex sur une échelle de temps de l'ordre d'une dizaine de secondes.

Le point II.F.1.7 (présence d'une seule protrusion à la fois) s'explique par le rôle joué par la pression hydrostatique dans un contexte de cytoplasme visqueux, qui va entraîner la progression du bord cellulaire là où la résistance mécanique est la plus faible.

Le point II.F.1.5 (absence de directionnalité persistante) nous amène à nous interroger sur les cinétiques de reformation du cortex dans la nouvelle protrusion, plus particulièrement les cinétiques d'augmentation de résistance mécanique de ce nouveau cortex, et la cinétique d'augmentation du nombre de liens avec la membrane, ceci considéré par référence à la cinétique de contraction. Considérons des cas extrêmes :

- si la cinétique d'augmentation du nombre de liens est très lente par rapport au taux de contraction et à la cinétique de polymérisation, la protrusion nouvellement formée constituera le point le plus faible de la liaison cytosquelette-membrane pour la cellule, et donc le bleb suivant devrait se produire dans le prolongement de son prédécesseur, donnant lieu à une motilité dirigée.
- si la cinétique de polymérisation est lente par rapport au taux de contraction (et que la cinétique d'augmentation du nombre de liens n'est pas limitante comme dans l'étape précédente) : alors c'est le cortex dans la nouvelle protrusion qui devrait constituer un point faible et se déformer continuellement en réponse à la contrainte générée par le reste de la cellule : on aurait ainsi une protrusion frontale permanente et une absence de blebs.

Donc pour observer des blebs successifs non corrélés, il faut que :

- la cinétique d'augmentation de liens cytosquelette-membrane dans la nouvelle protrusion ne soit pas limitante par rapport à la polymérisation ; on pourrait objecter que les liens ne peuvent se former avant qu'un cortex ait polymérisé (certes), mais dans le détail ces phénomènes relèvent d'une géométrie différente : la formation des liens cytosquelette-membrane se produit en 2D, mais la polymérisation en 3D. En d'autres termes, on peut parfaitement imaginer un taux de formation/renouvellement des liens cytosquelette-membrane plus rapide que le temps de renouvellement du cortex dans son épaisseur, par ce biais la liaison cytosquelette-membrane dans la nouvelle protrusion pourrait atteindre une valeur similaire à celle du reste de la cellule avant que son cortex sous-jacent ait atteint son épaisseur d'équilibre.
- la cinétique de reformation du cortex soit suffisamment rapide pour arrêter la protrusion (faute de quoi la cellule serait polarisée définitivement).

En d'autres termes, la simple modification de la dynamique de la liaison cytosquelette-membrane peut permettre de passer d'une motilité par blebs aléatoire à une motilité par blebs dirigée ; ceci pourrait expliquer pourquoi,

en l'absence de chemoattractant, on observe pour certains types cellulaires du blebbing directionnel (cas des carcinosarcomes Walker détaillé section I.B.2.c), et pour d'autres types cellulaires comme *E. histolytica* une motilité « aléatoire ».

Un point annexé qui a été décrit section II.D.4 est l'occurrence de blebs avec des vitesses initiales particulièrement élevées pour des départs en zone concave ; il a été souligné que la spécificité de ces emplacements, considérée en 3D, est que les deux courbures principales sont de signe opposé, au lieu d'être toutes deux convexes comme pour la plupart de l'enveloppe cellulaire. Or la vitesse d'expansion v de la membrane soumise à une pression ΔP peut s'écrire²⁴ : $v = \frac{\Delta P}{\eta}$. La vitesse de la membrane immédiatement après la disjonction est donc $v^* = \frac{f^*}{\eta}$, et la dissipation joue donc un rôle essentiel pour limiter la vitesse d'expansion. La dissipation provient de deux sources : l'une due au flux latéral de membrane ([Brochard-Wyart *et al.*, 2006]), et l'autre due au flux de cytosol à travers le cortex ; le second effet n'est prépondérant que pour les petites déformations membranaires ([Brugues, 2008]), et donc pour les vitesses v^* mesurées expérimentalement c'est la friction lors de l'apport latéral de membrane qui fait office de paramètre de contrôle. Or, les zones concaves présentent la spécificité par rapport au reste de la cellule de pouvoir fournir localement de la membrane à faible dissipation, simplement par la géométrie localement inversée de la courbure (voir figure II.41) : ceci est donc un moyen d'expliquer pourquoi les vitesses v^* observées en zone concave sont plus élevées que sur le restant du pourtour cellulaire.

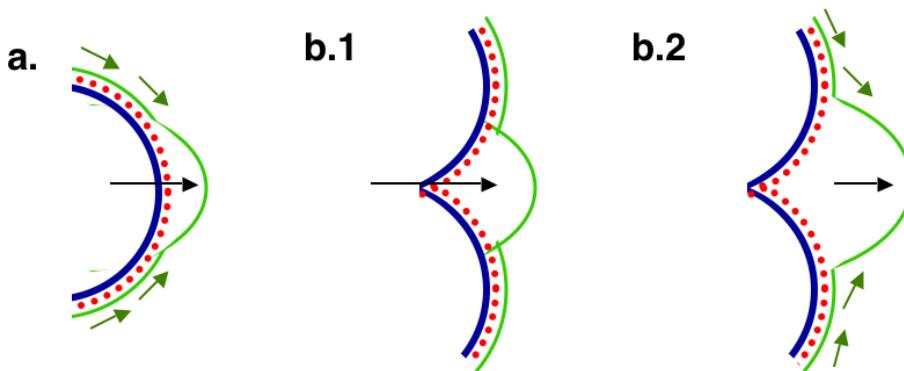


FIG. II.41: Schéma explicatif des différences de vitesse initiales v^* entre zones convexes et concaves. a. Bleb initié en zone convexe : dès les premiers instants de développement du bleb, un apport latéral de membrane est nécessaire, ce qui entraîne de la dissipation. b. Bleb initié en zone concave : la géométrie locale permet un développement initial sans apport latéral de membrane (b.1) donc avec une dissipation réduite par rapport au cas a. ; dans les phases ultérieures (b.2), un apport latéral de membrane est à nouveau requis.

²⁴en définissant η , la viscosité effective par unité de longueur.

II.F.4 Mise à l'épreuve du modèle

Dans le chapitre suivant (III), nous allons tester les prédictions de notre modèle en jouant sur ses paramètres : rôle de la pression exercée sur les liens cytosquelette-membrane, à la fois globalement (section III.A) et localement (section III.B) ; rôle de la contractilité (section III.C) ; rôle du taux de renouvellement du cortex (section III.D)) ; mais devant la complexité de la stochastique protrusive, vraisemblablement due à un couplage entre cinétique protrusive et morphologie cellulaire très évolutive chez *E. histolytica*, nous nous placerons dans des conditions de géométrie simplifiée avec pour but d'obtenir un comportement plus régulier, modélisable quantitativement (section III.E).

Chapitre III

Validations qualitatives et quantitatives du modèle de motilité par disjonction

III.A Rôle global de la pression

La pression exercée par le cortex sur la membrane est un élément-clé du processus de disjonction décrit dans notre modèle section II.F. Nous présentons ici diverses méthodes pour agir sur ce paramètre et voir si les effets résultants sont compatibles ou non avec les prédictions.

En effet, si l'on applique une perturbation mécanique sur la membrane correspondant à une pression ΔP , l'équilibre des forces sur les liens cytosquelette-membrane est modifié en : $f = \Delta P + 2\frac{\gamma_m}{R}$; selon le signe de ΔP (pression ou dépression), on favorise ou on défavorise le processus de disjonction. Notons que notre hypothèse de viscoélasticité du cytosquelette implique que cette contrainte ΔP est relaxée sur un temps d'ordre τ^* .

III.A.1 Rôle global de la pression : investigations en jouant sur la perméabilité membranaire

Un premier moyen pour jouer sur l'équilibre de pression à la jonction cytosquelette-membrane est une perméabilisation de la membrane. En utilisant un agent chimique, la digitonine, on peut obtenir une perméabilisation modérée de l'ensemble de la membrane plasmique (voir par exemple [Mackay *et al.*, 1997]). Le résultat observé (figure III.1) est une diminution, assez progressive, de motilité. Néanmoins nous n'avons pas poursuivi ces expériences, car le procédé comporte clairement des artefacts (en perméabilisant la membrane on va entraîner une perte par diffusion vers l'extérieur de composés intracellu-

laires, processus que l'on ne contrôle ni qualitativement ni quantitativement). Augmenter la durée d'application ou les doses peut conduire à une lyse cellulaire, cette méthode présente donc trop d'artefacts pour être interprétable ne serait-ce que qualitativement de façon efficace.

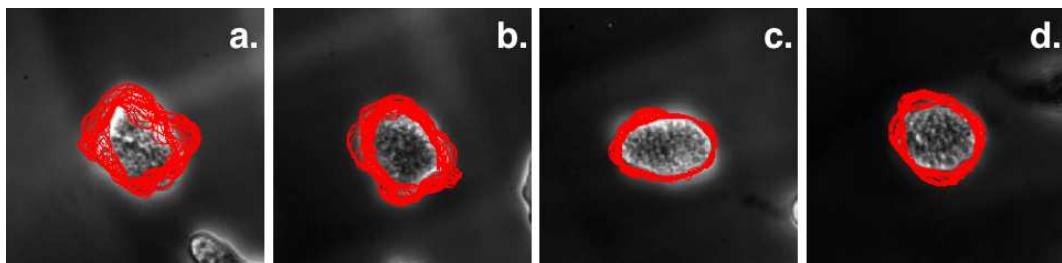


FIG. III.1: Perméabilisation de la membrane par digitonine (concentration de travail : $40 \mu \text{g} / \text{ml}$) (les images sont créées par superposition de contours après recentrage sur le centre géométrique, 1 contour / seconde sur 30 secondes). a) cellule avant l'application de la digitonine. b) cellule après quelques minutes d'application. c) cellule après une dizaine de minutes d'application. d) cellule après changement de bain et retour en milieu usuel.

III.A.2 Rôle global de la pression : investigations en jouant sur la pression osmotique

III.A.2.a Choix des solutés utilisés pour les expériences d'osmolarité

Habituellement, les agents osmotiques utilisés sont des sucres (sucrose ou sorbitol) ; nous avons essayé d'autres molécules avec l'idée de pouvoir disposer de contrôles expérimentaux en cas d'artefacts dus à une réaction spécifique des cellules à un sucre donné¹ : ainsi différents PEGs, mais les PEGs à masse molaire moyenne sédimentent trop rapidement pour être utilisables², et les PEGs à plus faible masse molaire donnent des mesures incorrectes à l'osmomètre³.

Après des tests préliminaires avec sucre et sorbitol, nous n'avons ni dans un cas ni dans l'autre décelé de réaction cellulaire spécifique à ces sucres, et avons donc utilisé indifféremment l'un ou l'autre en fonction des expériences.

¹le risque qu'une telle réaction est d'ailleurs très limité, car ces sucres ne sont habituellement pas métabolisables directement par les unicellulaires.

²il en est ainsi pour les PEGs 3400 et 2000.

³PEGs 600 et 300.

III.A.2.b Pression osmotique, principe théorique

Nous cherchons ici à comprendre comment une perturbation osmotique globale est transmise sur la jonction cytosquelette-membrane, et comment elle est relaxée. Commençons d'abord par revenir sommairement sur le mode d'action de la pression osmotique : pour cela, on considère une membrane semi-perméable (perméable au solvant mais non aux solutés), telle que décrite figure III.2.A ; si l'on ajoute dans chaque compartiment une même concentration de soluté, le potentiel chimique sera le même de part et d'autre et les flux de solvant à travers la membrane seront équilibrés ; mais s'il y a une différence de concentration initiale ΔC_0 , un flux de solvant va se produire, du compartiment le moins concentré en direction du compartiment le plus concentré. Ainsi, sur notre schéma, le niveau d'eau va monter dans le compartiment initialement le plus concentré, jusqu'à une hauteur d'équilibre telle que la différence de pression hydrostatique résultante contrebalance les flux de solvants dus à la différence de potentiel chimique. C'est cette pression hydrostatique capable de contrebalancer la différence de potentiel chimique que l'on appelle pression osmotique, et son expression est donnée par l'équation de Van't Hoff⁴ :

$$\Pi_0 = RT\Delta C_0 \quad (\text{III.1})$$

Dans le cas exposé figure III.2.A, la membrane est fixe et rigide ; or, dans le cas d'une vésicule (ou d'une cellule), la membrane est déformable, ce qui revient à considérer un piston mobile (figure III.2.B). Ceci modifie quelque peu les choses : la différence de potentiel chimique initiale entraîne des flux de solvant, qui vont conduire à une augmentation de pression hydrostatique du côté initialement le plus concentré ; cette différence de pression hydrostatique produit une pression sur le piston, cette pression étant relaxée par un déplacement du piston qui permet une réduction de la différence de concentration (et donc de potentiel chimique) entre les compartiments. A l'état final, le déplacement du piston a entraîné un équilibrage des concentrations entre les deux compartiments ($\Delta C(t \leftarrow \infty) = 0$), et la pression résultante sur le piston est donc nulle. Les choses sont similaires pour une vésicule ou une cellule (figure III.2.C), à un changement de géométrie près.

Rajoutons à présent le cortex, sous forme d'un gel modélisé par un modèle de Maxwell avec un temps de relaxation effectif τ^* , et lié à la membrane par des liens de résistance finie f^* (figure III.3) ; si l'on applique une pression osmotique Π_0 instantanée :

- dans le cas d'une surpression (figure III.3.A), la membrane est comprimée contre le cortex, avec $f(t < \tau^*) = \Pi_0 + 2\frac{\gamma_m}{R}$ (ici $\Pi_0 < 0$), et au bout d'un temps d'ordre τ^* la réduction de volume cellulaire sera effective, avec un retour à $f(t > \tau^*) = 2\frac{\gamma_m}{R}$.

⁴où R est la constante des gaz parfaits - $R = 8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T la température et ΔC_0 la différence de concentration molaire en solutés entre les 2 compartiments.

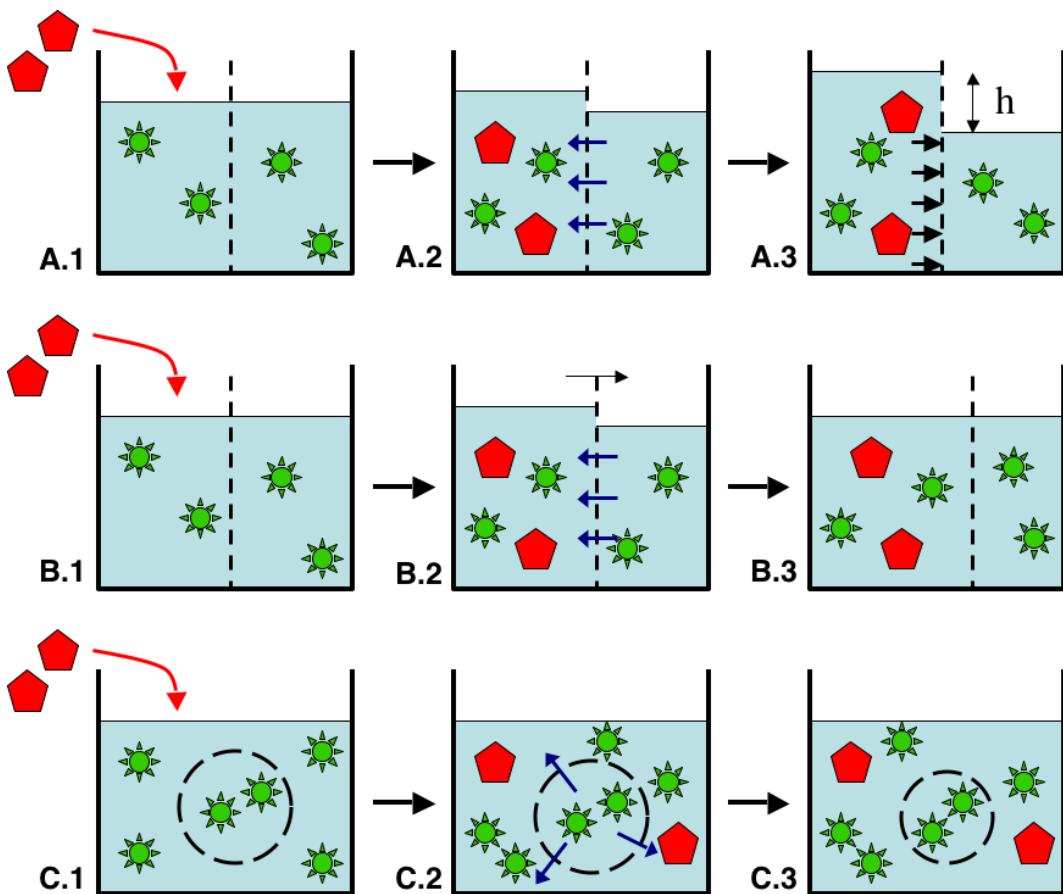


FIG. III.2: Réaction à une perturbation osmotique, 3 cas d'école : A). 2 compartiments séparés par une membrane fixe ; B). 2 compartiments séparés par une membrane mobile ; C). une vésicule dans un réservoir. Inspiré de [Freifelder, 1985]

- dans le cas d'une dépression (figure III.3.B), la membrane sera mise sous tension par rapport au cortex, avec $f(t < \tau^*) = \Pi_0 + 2\frac{\gamma_m}{R}$ (ici $\Pi_0 > 0$), et au bout d'un temps d'ordre τ^* l'augmentation de volume cellulaire sera effective, avec un retour à $f(t > \tau^*) = 2\frac{\gamma_m}{R}$.

Mais pour l'instant, nous avons supposé une perméabilité infinie de la membrane par rapport au passage du solvant, ou du moins si grande qu'elle ne soit pas cinétiquement limitante par rapport au temps de relaxation du cortex τ^* . Or en pratique, les temps de changement de volume sont non négligeables, de l'ordre de quelques centaines de secondes pour des vésicules (par ex. [Boroske *et al.*, 1981]). Or, si la perméabilité devient limitante, il faut tenir compte d'une pression de résistance visqueuse supplémentaire Π_r , de sorte que le bilan des forces sur les liens cytosquelette-membrane devient :

$$f = (\Pi - \Pi_r) + 2\frac{\gamma_m}{R}$$

On peut supposer cette pression Π_r proportionnelle au flux de solvant à

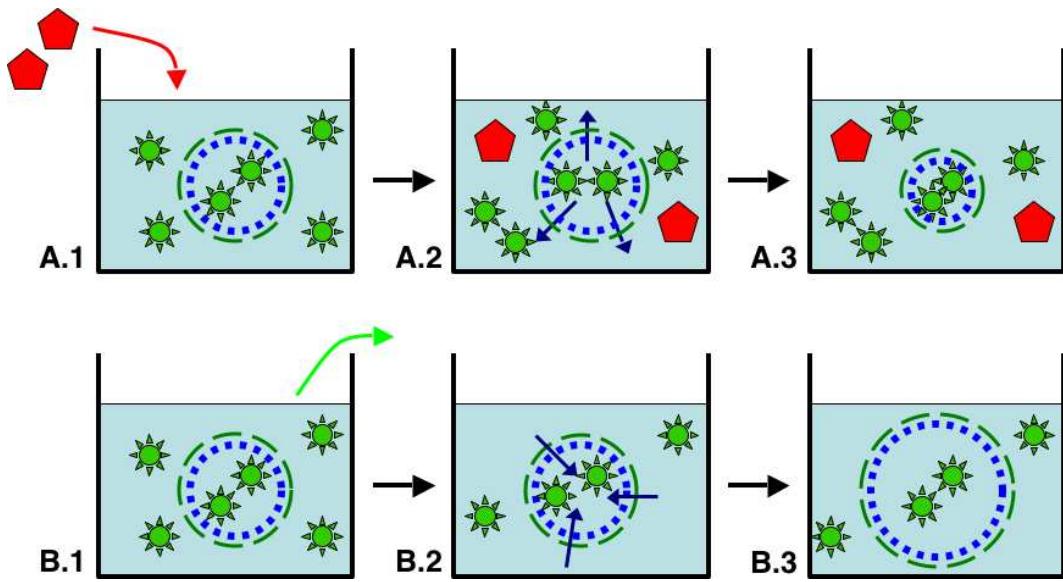


FIG. III.3: Application d'une pression osmotique sur une cellule. A.1 : application d'une surpression osmotique externe, A.2 : phase transitoire de réduction de volume ; A.3 : état final après réduction de volume cellulaire. B.1 : cas d'une dépression osmotique externe. B.2 : phase transitoire d'augmentation de volume. B.3 : état final après augmentation de volume cellulaire.

travers la membrane, or le flux de solvant à travers la membrane résultant d'une perturbation osmotique est donné par l'expression⁵ :

$$j = -L_p \Delta C(t)$$

De sorte que l'hypothèse $\Pi_r \propto j$ conduit à $\Pi_r \propto \Delta C(t)$, ce qui combiné à l'équation III.1 nous permet d'écrire : $\Pi(t) - \Pi_r(t) = \lambda \Pi(t)$, où $0 < \lambda < 1$. Le bilan des forces sur les liens cytosquelette-membrane s'écrit alors :

$$f(t) = \lambda \Pi(t) + 2 \frac{\gamma_m}{R(t)}$$

Toute la question consiste alors à déterminer l'ordre de grandeur de λ . Soit τ' le temps caractéristique dû à la perméabilité L_p pour relaxer une pression osmotique ΔC_0 , alors :

- si $\frac{\tau'}{\tau^*} \ll 1$: la perméabilité n'est pas limitante ($\lambda \simeq 1$), au bout d'un temps τ' la contrainte sur les liens est $f(\tau' < t < \tau^*) = \Pi_0 + 2 \frac{\gamma_m}{R}$, et au bout d'un temps d'ordre τ^* le changement de volume cellulaire sera effectif, avec un retour à $f(t > \tau^*) = 2 \frac{\gamma_m}{R}$.
- si $\frac{\tau'}{\tau^*} \gg 1$: la perméabilité devient limitante. On peut faire l'hypothèse

⁵avec j la densité de flux molaire et L_p la perméabilité, qui a la dimension d'une vitesse.

que $\lambda \simeq \frac{\tau^*}{\tau'}$, alors en première approximation :

$$f(\tau^* < t < \tau') = \frac{\tau^*}{\tau'} \Pi(t) + 2 \frac{\gamma_m}{R}$$

et au bout d'un temps d'ordre τ' le changement de volume cellulaire sera effectif, avec un retour à $f(t > \tau') = 2 \frac{\gamma_m}{R}$.

III.A.2.c Importance relative de la perméabilité

On vient donc de voir qu'un point essentiel lorsqu'on utilise la pression osmotique est d'estimer les ordres de grandeur des paramètres τ' et τ^* . On a vu section II.F.2 que pour notre système l'ordre de grandeur pour τ^* était la dizaine de secondes. Pour τ' , des mesures sur vésicules donnent des ordres de grandeur de quelques centaines de secondes (par exemple [Boroske *et al.*, 1981]) ; pour des cellules vivantes, la présence de canaux divers comme les aquaporines ([Verkman, 2005]) est susceptible d'augmenter fortement la perméabilité, ce qui conduit à des valeurs caractéristiques pour τ' allant de quelques dizaines à quelques centaines de secondes selon le type cellulaire ([Zelenina and Brismar, 2000], [Verkman, 2000], [Lucio *et al.*, 2003]) ; en ce qui concerne les cellules présentant une motilité par blebs, [Fedier and Keller, 1997] donne comme estimation de ce paramètre pour les carcinosarcomes Walker une valeur inférieure à la dizaine de secondes. En bref, selon le système cellulaire considéré, on a des valeurs de τ' dispersées sur plus d'un ordre de grandeur, et une dispersion encore plus importante pour le rapport $\frac{\tau^*}{\tau'}$. Il nous faut donc estimer la valeur de τ' pour notre système par des mesures directes, ce que nous allons voir section III.A.2.d.

Notons que certains auteurs ont fait signalé que dans le cas d'un cytoplasme poroélastique (cytoplasme composé d'un réseau élastique avec une taille de pore fine, baigné dans un fluide interstitiel), la perméabilité interne au cytoplasme pouvait être un facteur limitant par rapport à la perméabilité membranaire ([Mitchison *et al.*, 2008]) ; mais pour *E. histolytica*, le cytoplasme est composé principalement d'un cytosol liquide rempli d'organelles de taille réduite (quelques microns au plus), sans structuration interne durable (voir par exemple la figure II.27 où les organelles ont un déplacement non cohésif), de sorte que l'on considère ici que c'est la perméabilité membranaire qui est limitante.

III.A.2.d Mesure de τ' par application d'une surpression osmotique

Un moyen d'estimer la valeur de τ' est d'appliquer une pression osmotique externe assez forte et d'observer avec quelle vitesse se produit la réduction de volume cellulaire. Notons qu'avec une osmolarité du milieu de 350 mM (valeur usuelle pour *E. histolytica*, et également typique pour les cellules mammifères

en général), ajouter 150 à 200 mM de composé osmotique conduit à une réduction de volume facilement détectable⁶, c'est donc la méthode que nous avons choisie.

Sur nos premières expériences d'osmolarité, il y avait plusieurs bains intermédiaires entre deux observations en conditions osmotiques différentes, soit un intervalle de temps de 3 à 4 minutes ; après analyse, il est apparu que la phase transitoire de changement de volume était suffisamment rapide pour s'opérer complètement avant la reprise des observations (figure III.4). C'était une première indication que τ' avait une valeur inférieure à 3-4 minutes. On note également sur cette figure III.4 qu'en revenant ensuite en milieu d'osmolarité standard, la cellule retrouve une géométrie et une motilité similaires à ce qui était vu dans les conditions de départ ; ceci permet de supposer que, sur la durée de l'expérience, il n'y a pas d'artefacts d'irréversibilité.

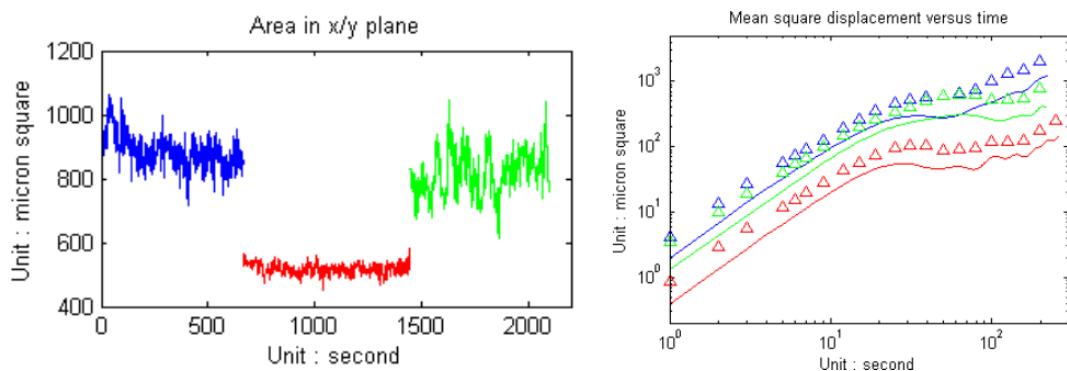


FIG. III.4: Changement de volume en réaction à une modification d'osmolarité extérieure, exemple de mesure sur une cellule soumise à une augmentation transitoire d'osmolarité de 150 mM. En bleu : dans milieu de culture usuel ; en rouge : dans milieu + 150 mM sucre ; en vert : milieu usuel à nouveau. Les triangles sur la figure représentant le déplacement quadratique moyen correspondent à la limite supérieure de la barre d'erreur. Entre chaque condition il y a un délai (non montré ici) de 3 à 4 minutes, le temps de faire quelques rinçages. L'aire est ici considérée comme un indicateur indirect du volume : en conditions normales, l'aire fluctue un peu (cf. figure II.20), mais ici les changements sont bien au-delà de ces simples variations naturelles, et nous les interprétons donc comme un effet de variation de volume. On observe que l'aire - et en conséquence le volume - est clairement réduite en conditions d'osmolarité externe forte : la phase de changement de volume n'est pas visible ici, ce qui indique qu'elle se produit en moins de 3-4 minutes.

Il a donc fallu observer de façon plus précoce, en supprimant les bains intermédiaires ; de la sorte, nous avons pu observer la phase de changement de volume (figure III.5), et voir qu'elle se produit en 1 à 2 minutes.

De ceci on peut déduire que $\tau' \simeq 100$ secondes, et donc que $\frac{\tau'}{\tau^*} \simeq 10$ en ordre de grandeur approximatif.

⁶un indicateur simple du volume cellulaire est, moyennant l'hypothèse que la cellule a des dimensions du même ordre de grandeur dans les 3 directions d'espace, l'aire géométrique apparente de la cellule dans le plan d'observation.

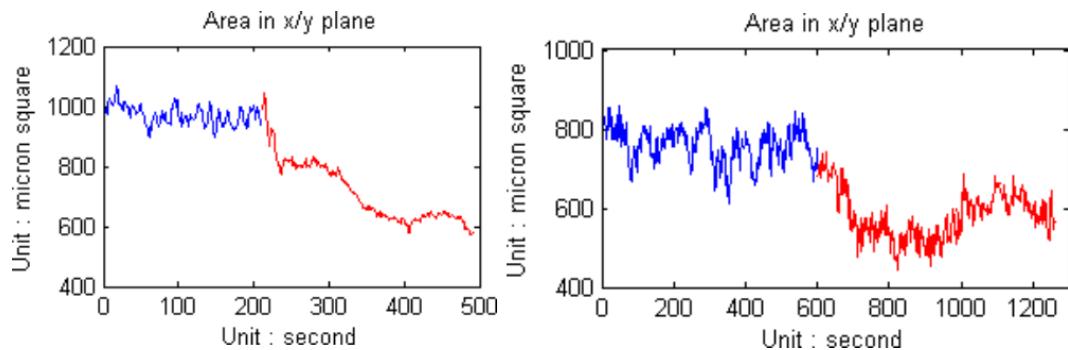


FIG. III.5: Observation de la phase transitoire de réduction de volume en réponse à une augmentation d'osmolarité extérieure (en bleu : milieu de culture usuel ; en rouge : augmentation d'osmolarité de 200 mM - graphe de gauche - et de 50 mM - graphe de droite).

III.A.2.e Effet à $t < \tau'$ pour une surpression externe

L'effet de la pression osmotique sur la jonction cytosquelette-membrane se produit donc dans le court laps de temps $t < \tau'$. Dans notre système, $\frac{\tau'}{\tau_*} \simeq 10$, donc la perméabilité à travers la membrane est limitante, si bien que la pression osmotique a une contribution $\frac{\tau^*}{\tau} \Pi(t)$ sur la jonction cytosquelette-membrane.

La figure III.6 détaille les résultats obtenus pour deux valeurs de ΔC_0 (resp. 200 et 50 mM) : dans les deux cas la fréquence et l'amplitude des protrusions sont réduites, en accord avec ce qui est attendu puisque l'on « augmente » la barrière à franchir pour permettre une disjonction ; mais l'effet diffère en intensité : fort à 200 mM, ce qui indique que la pression appliquée est largement supérieure à f^* , et plus faible à 50 mM, ce qui indique que l'on s'approche de l'ordre de grandeur de f^* . En supposant $\frac{\tau'}{\tau_*} = 10$, la correspondance en terme de pression physique est respectivement de 50 000 Pa ($\gg f^*$) et 12 000 Pa ($\simeq f^*$), ce qui n'est pas très éloigné de la fourchette haute des estimations de f^* faites à la section II.F.2.c.

III.A.2.f Effets d'une dépression externe

Nous avons également testé l'effet de l'application d'un milieu externe hypotonique. Il faut noter qu'une expérience de cette nature peut comporter plus d'artefacts que dans le cas de l'application d'un milieu hypertonique : en effet un milieu hypertonique est composé du milieu usuel auquel on ajoute un composé osmotique supposé neutre, alors qu'un milieu hypotonique doit retrancher une fraction des composés du milieu usuel, ce qui peut induire une réaction spécifique de la cellule à l'absence d'un composé physiologique essentiel. Si l'on suppose que les effets - au moins aux temps courts - sont purement osmotiques, l'effet accompagnant l'augmentation de volume est d'accroître la contrainte sur la liaison cytosquelette-membrane et donc de faciliter la disjonction.

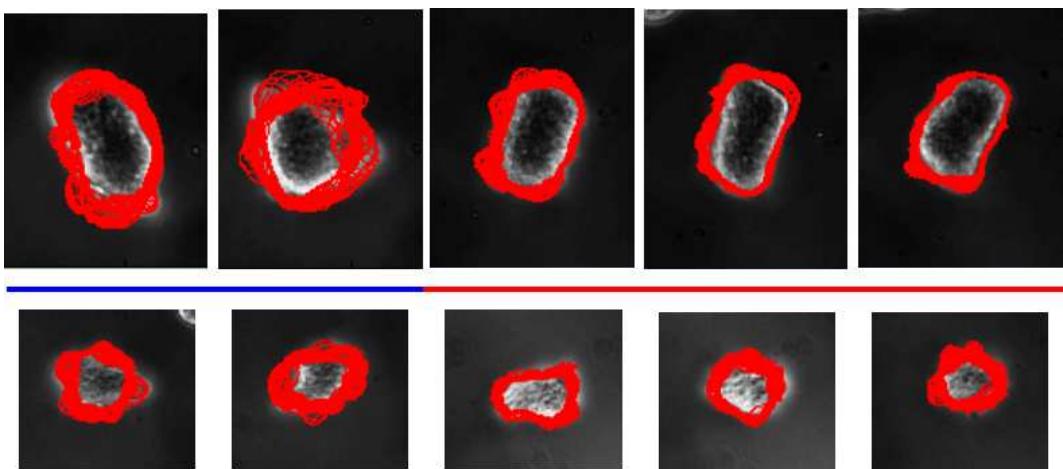


FIG. III.6: Observation de l'effet d'une osmolarité externe accrue de 200 mM (en haut) et 50 mM (en bas). Les images sont créées par superposition de contours après recentrage sur le centre géométrique, 1 contour / seconde sur 30 secondes. 2 premières images de la série : amibes en conditions d'osmolarité standard. 3 images suivantes : observations consécutives à l'accroissement de l'osmolarité externe, durant la phase transitoire de changement de volume.

L'expérience faite ici a simplement consisté à échanger le milieu contenu dans la partie supérieure de la chambre d'observation contre un milieu d'isotonnicité nulle : de l'eau simple. Le résultat après homogénéisation est un milieu d'isotonnicité très faible par rapport au milieu standard. Les résultats sont décrits figure III.7. Première remarque : il n'y a pas d'effet de volume perceptible, ce qui suggère soit que l'apport de membrane nouvelle pour accompagner l'augmentation de volume est très limitante, soit qu'il y a des mécanismes alternatifs de régulation osmotique ; quoi qu'il en soit, en l'absence d'effet de volume, il n'y a pas d'effet physique associé à l'hypoosmolarité sur l'équilibre des forces entre le cytosquelette et la membrane. Une deuxième remarque est que malgré cette absence d'effet de volume, il y a un effet sur la motilité cellulaire (qui est très réduite), mais son interprétation est délicate (probablement des efflux cytosoliques).

III.A.2.g Conclusion

Nous avons donc vu (section III.A.2.e) que l'application d'une pression osmotique externe limite la formation des protrusions : ceci est en accord avec le modèle (décrit section II.F.3) puisqu'en augmentant la pression nécessaire à la disjonction cytosquelette-membrane, on défavorise les protrusions générées par disjonction.

Par contre nous n'avons pas d'interprétation simple pour les expériences menées en conditions osmotiques réduites (section III.A.2.f), dans lesquelles la motilité est fortement altérée mais sans effet de changement de volume

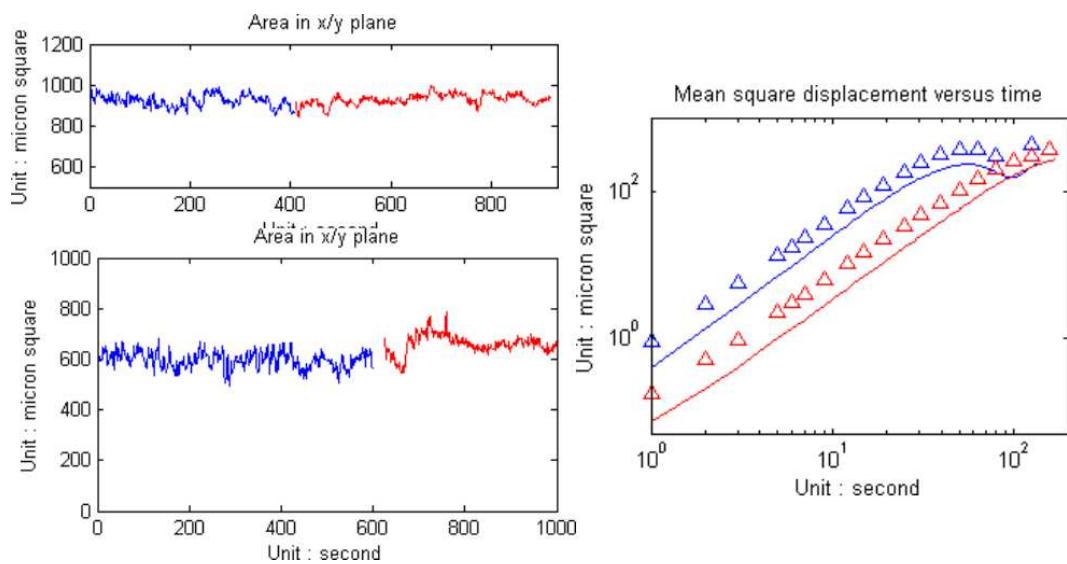


FIG. III.7: Réponse à l'application d'une osmolarité réduite. En bleu : cellule en conditions usuelles ; en rouge : osmolarité extérieure réduite. A gauche : 2 exemples d'aire géométrique en fonction du temps. A droite : déplacement quadratique moyen (les triangles correspondent à la limite supérieure de la barre d'erreur).

apparent.

De façon semi-quantitative, les résultats obtenus par application d'une pression osmotique externe (section III.A.2.e) donnent un ordre de grandeur grossier pour f^* autour de 10^4 Pa, ce qui est un peu supérieur à l'ordre de grandeur attendu (section II.F.2.c), mais néanmoins correct au vu du caractère approximatif de la technique.

III.B Rôle local de la pression

Dans cette section, nous nous intéressons au rôle local de la pression. En effet, d'après notre modèle :

- une force appliquée localement devrait permettre de nucléer une disjonction, donnant naissance à une protrusion similaire à celles observées en conditions standard (section III.B.1).
- si l'hypothèse de cytoplasme liquide (= non-poroélastique) est justifiée, on doit pouvoir inhiber l'ensemble des protrusions par une perméabilisation localisée de la membrane (section III.B.2).

III.B.1 Application de forces locales via une micropipette, aspects qualitatifs

Une micropipette permet d'appliquer une force locale (surpression ou dépression) ; de la sorte, nous devrions pouvoir abaisser ou augmenter localement le seuil de pression à atteindre pour permettre la disjonction cytosquelette-membrane, ce qui favorise (resp. défavorise) la création d'une protrusion à cet endroit. Nous avons ainsi observé qu'en appliquant une aspiration continue, on génère des protrusions en série (figure III.8), tandis qu'à l'équilibre de pression on observe des protrusions de part et d'autre (figure III.9).

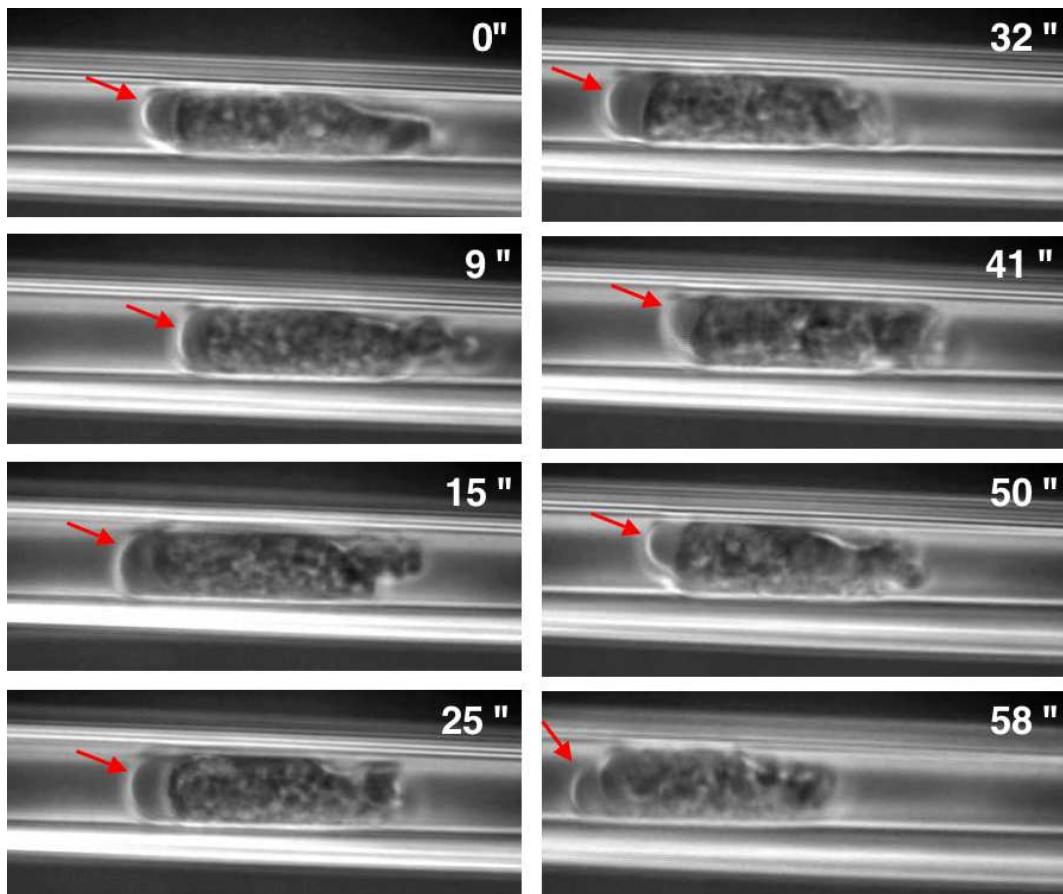


FIG. III.8: Cellule sur laquelle est continuellement appliquée une pression d'aspiration moyenne (500 Pa) (sur ces images aspiration du côté gauche de la pipette). Les disjonctions suivies de protrusions (pointées par les flèches rouges), qui se produisent plus ou moins régulièrement, ont systématiquement lieu du côté où est appliquée l'aspiration.

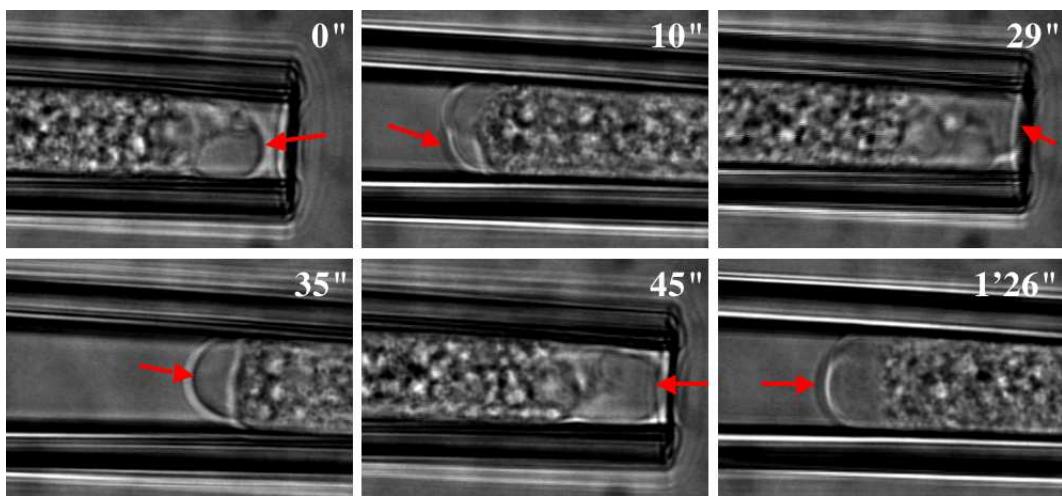


FIG. III.9: Cellule à l'équilibre de pression dans la micropipette. Des protrusions se produisent aussi bien vers l'intérieur que vers l'extérieur de la pipette, ce qui indique des pressions équivalentes sur les deux bords cellulaires libres.

III.B.2 Relaxation de la contrainte à la jonction cytosquelette-membrane par perméabilisation locale

Nous avons dans une section précédente utilisé un agent chimique pour perméabiliser la membrane (section III.A.1) ; mais l'effet avait une cinétique trop lente pour donner un résultat exploitable. Ici, nous avons donc utilisé un processus d'électroporation électrique (méthodologie inspirée de [Kitamura *et al.*, 2008], l'appareil utilisé étant un Axoporator 800A prêté par l'équipe d'Isabel Llano - Université Paris 5, laboratoire de Physiologie Cérébrale). L'une de deux électrodes est placée dans une micropipette, ce qui permet l'application d'un champ local via l'embout de cette micropipette. L'effet est donc instantané, et bien localisé dans le temps ; et il est également localisé spatialement (figure III.10).

Des premiers tests ont montré que :

- un temps d'application trop court, de l'ordre de la seconde par exemple, ne donne pas d'effet visible (à part la lyse de la cellule en cas de voltage un peu trop élevé).
- un temps d'application trop long (une trentaine de secondes par exemple) conduit certes à une inhibition de la motilité durant l'application, mais est trop invasif pour la cellule qui ne reprend que très difficilement sa motilité une fois l'application terminée.

Un temps d'application similaire à la période des protrusions, de l'ordre de la dizaine de secondes, est donc un bon compromis. Le résultat est illustré figure III.11 : du blebbing est observé avant l'application des pulses électriques, il cesse totalement pendant l'application (bien que l'activité contractile se poursuive), et il reprend dès la cessation des pulses (indiquant que l'application des

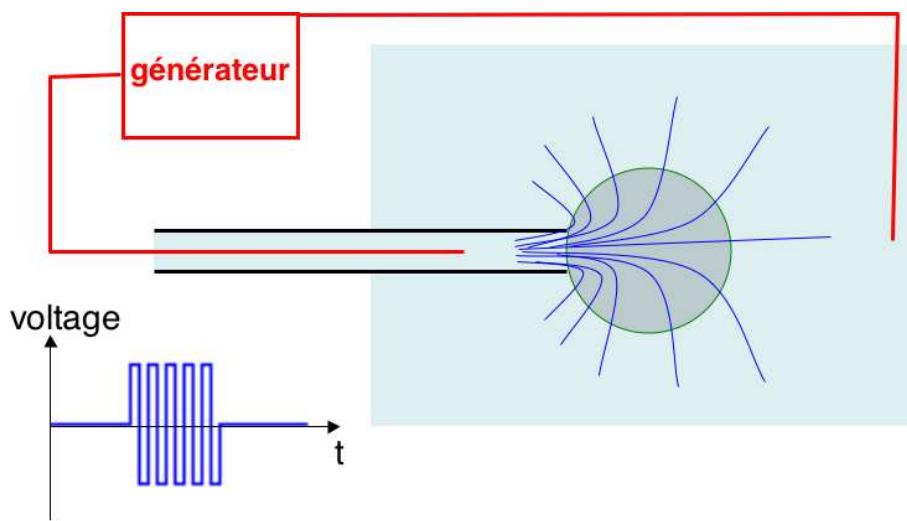


FIG. III.10: Principe de l'électroporation : une des électrodes baigne dans le milieu d'observation et l'autre est insérée à l'intérieur de la micropipette ; le générateur permet de délivrer des séries de pulses d'amplitude / forme / durée contrôlées. Sur le schéma on a représenté en bleu l'allure supposée des lignes de champ, avec un effet dont l'intensité est maximale à proximité immédiate de l'embout de la micropipette.

pulses n'a pas trop perturbé la cellule).

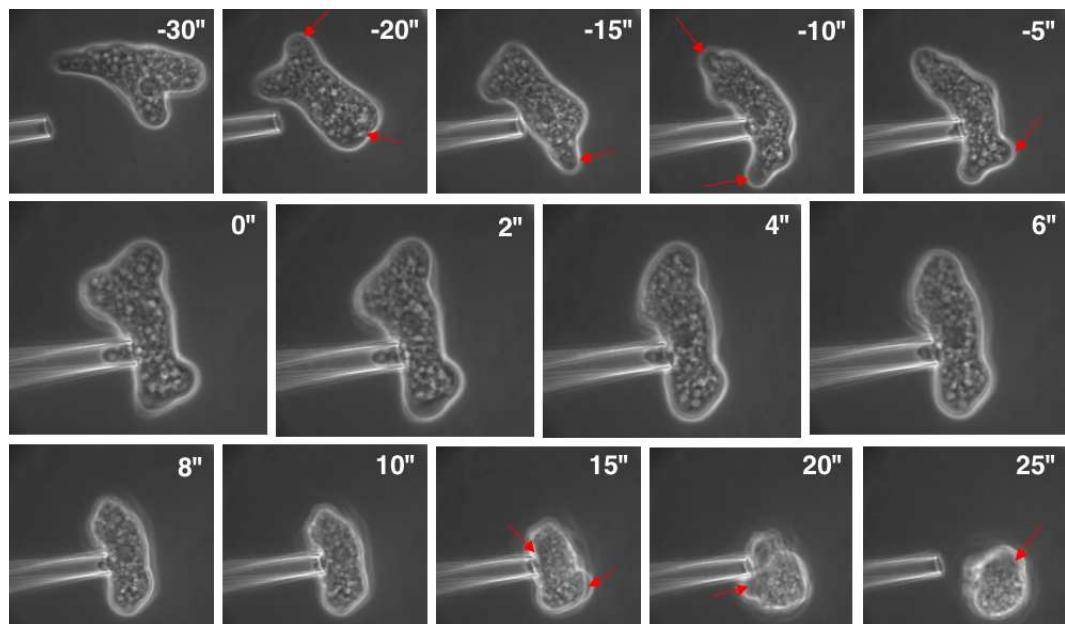


FIG. III.11: Expérience d'électroporation : pulses de +/- 6V, de largeur 1 ms, de fréquence 100 Hz, durant 10 secondes (résistance nominale de la pipette : 24,5 M-Ohms). Les flèches rouges soulignent les protrusions en cours de développement. L'électroporation est appliquée entre $t=0$ et $t=10$ sec.

III.B.3 Conclusions

Nous avons donc vu qu'en appliquant une force locale par une micropipette (section III.B.1), nous influençons localement la génération des protrusions, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un seuil de pression à atteindre pour permettre la disjonction cytosquelette-membrane ; pour déterminer si la pression s'équilibre - où non - à l'échelle de la cellule, nous avons utilisé une expérience de perméabilisation locale (section III.B.2) : nous en avons déduit qu'une relaxation locale de pression avait un effet sur l'ensemble de la cellule, indiquant un contrôle global de la pression, ce qui était un point important de notre modèle pour la compréhension du mécanisme de motilité aléatoire (section II.F.3).

III.C Rôle de la contractilité

Le taux de contractilité du cortex est, selon notre modèle, un élément important dans le contrôle de la cinétique de motilité :

- il influe sur la fréquence de disjonction, puisqu'il régule l'accumulation de stress dans le cortex, et par là même la contrainte sur la jonction cytosquelette-membrane.
- une fois que la disjonction a eu lieu, il influe sur la dynamique de développement des protrusions.

En ce qui concerne l'augmentation de la contractilité, nous avons fait quelques tests avec la calyculine-A ([Ishihara *et al.*, 1989]), à qui est généralement attribuée un effet d'augmentation d'activité des myosines via son rôle inhibiteur sur la phosphatase 2-A (schéma III.12) ; d'autres auteurs ont fait état d'un effet inhibiteur de la calyculine-A sur la croissance d'*E. histolytica* ([Chaudhuri and Raha, 2000]) ; pour notre part, des résultats préliminaires n'ont pas mis en évidence d'effet très net de cette drogue sur la motilité des amibes ; de plus, cet inhibiteur a un spectre d'action relativement large, ce qui complique l'analyse des résultats obtenus en l'utilisant ; nous n'avons donc pas poursuivi les tests avec cette drogue.

Pour ce qui est de l'inhibition de l'activité contractile des myosines, l'inhibiteur le plus couramment employé actuellement contre la myosine II est la blebbistatine ([Straight *et al.*, 2003]) ; sa spécificité est en effet très bonne, le revers de la médaille étant que cet inhibiteur a été développé contre des myosines mammifères, et donc qu'il n'est que peu ou pas efficace contre les myosines II d'autres espèces (la drosophile, pour n'en citer qu'une). Les tests que nous avons pu faire avec *E. histolytica* n'ont pas montré d'effet notable de la blebbistatine utilisée à concentration usuelle chez cette amibe (données non présentées ici). Nous nous sommes donc tourné vers d'autres inhibiteurs : ML-7 et Y-27632, qui inhibent respectivement MLCK et Rho-K, deux kinases impliquées dans la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine

(voir schéma III.12).

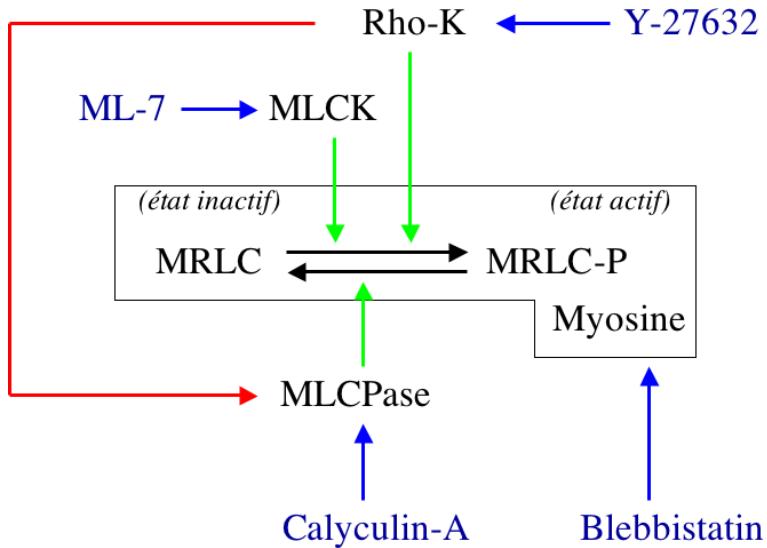


FIG. III.12: Schéma simplifié de la régulation de l'activité de la myosine II, et mode d'action de différentes drogues (adapté de [Fabian *et al.*, 2007]). La blebbistatine est un inhibiteur direct ; ML-7 et Y-27632 agissent sur deux kinases qui permettent la transition vers l'état activé de la myosine ; la calyculine est supposée agir sur une phosphatase qui permet la transition vers l'état inactif de la myosine.

Le résultat de l'utilisation conjointe de ces deux drogues (ML-7 et Y-27632) est une disparition des disjonctions cytosquelette-membrane et une réduction notable de la motilité cellulaire (figure III.13), conformément aux attendus de notre modèle décrit à la section II.F.2.

III.D Rôle du taux de renouvellement du cortex d'actine

Le taux de renouvellement du cortex d'actine est un autre paramètre de contrôle important de la motilité, comme nous le décrivons dans notre modèle section II.F.2. Il affecte en effet :

- la capacité du cortex à accumuler du stress (le renouvellement du cortex relaxe le stress accumulé).
- la dépolymérisation du cortex à la base des blebs (dépolymérisation nécessaire pour permettre à la cellule de se projeter dans la protrusion nouvellement formée).
- la vitesse de reformation du cortex dans un bleb nouvellement formé (qui d'une part stoppe la progression de la protrusion mais aussi permet de réaugmenter le stress sur la jonction cytosquelette-membrane en vue du prochain événement de blebbing).

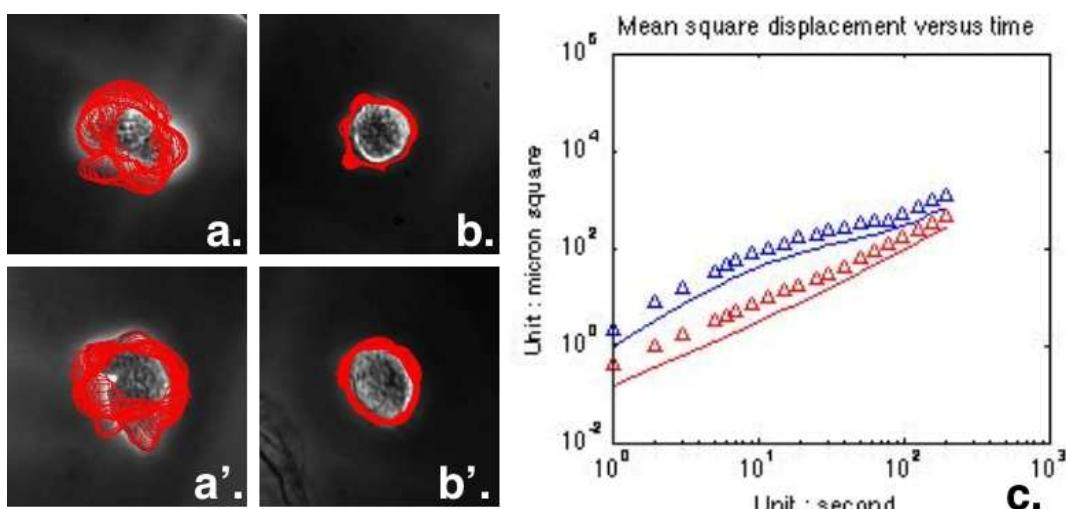


FIG. III.13: Effet combiné des drogues ML7 et Y27632 (ML7 50 μM + Y27632 40 μM). a) et a') : motilité de cellules avant l'application de la drogue (superposition de contours après recentrage sur le centre géométrique, 1 contour / seconde sur 30 secondes). b) et b') motilité des cellules correspondantes pendant l'application de la drogue. c) Déplacement quadratique moyen (les triangles correspondent à la limite supérieure de la barre d'erreur). En bleu : cellule avant l'application des drogues ; en rouge : cellule pendant l'application des drogues.

Nous avons choisi ici de nous intéresser à l'effet de l'augmentation de ce temps. Pour ceci, une drogue utilisable est la jasplakinolide, dont l'effet est de stabiliser l'actine-F⁷. En théorie, on pouvait prédire, entre autres, des phases de blebs plus marquées (dues à une plus grande persistance du cortex basal), mais une motilité du même ordre pour peu que la contractilité ne soit pas directement affectée. En pratique (figure III.14), l'application de la drogue entraîne une forte réduction de la motilité. Les événements de disjonctions sont inhibés, et l'on observe essentiellement des déformations lentes de la forme cellulaire, conduisant notamment à des morphologies cellulaires transitoires bicentriques assez étranges (voir notamment figure III.14.b). Les raisons de cet effet ne sont pas très claires ; une explication possible est qu'en limitant la dépolymérisation, on augmente la densité d'actine au contact de la membrane, donc la densité de liens cytosquelette-membrane ρ_b , et par-là même, la pression critique de disjonction f^* . Une autre explication pourrait être un effet de désorganisation partielle du cortex ([Bubb *et al.*, 2000]), qui entraînerait une contractilité moindre, d'où une inhibition des processus de disjonction et une réduction de la motilité en général. En l'état actuel de nos investigations, il est difficile de trancher entre ces deux hypothèses, qui d'ailleurs pourraient agir de concert pour rendre compte de l'effet observé.

⁷noter que les effets *in vivo* peuvent être assez complexes, avec une augmentation de densité corticale, mais aussi une modification qualitative du cortex avec une désorganisation des fibres de stress et la formation d'agrégats d'actine-F : voir [Bubb *et al.*, 2000] pour une discussion plus complète.

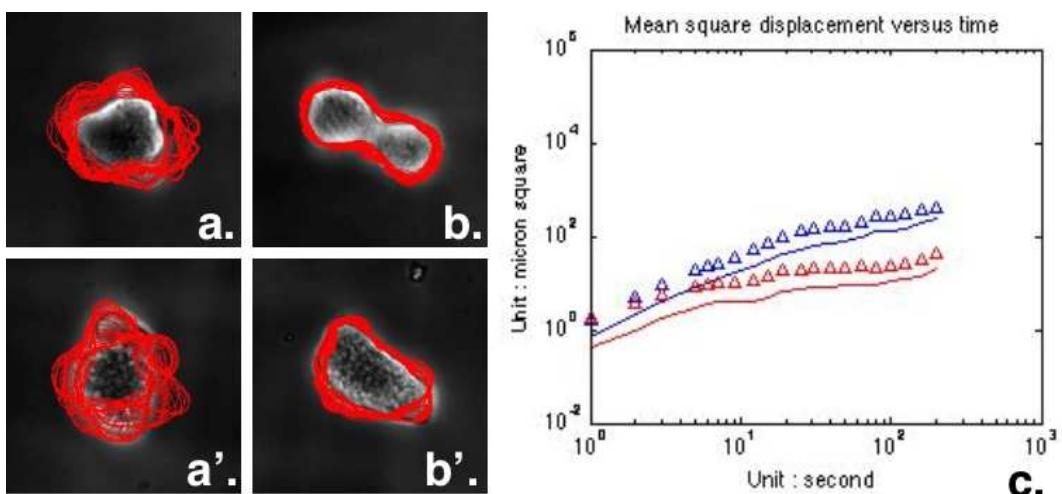


FIG. III.14: Effet du traitement à la jasplakinolide (concentration : 200 nM). a) et a') : motilité de cellules avant l'application de la drogue (superposition de contours après recentrage sur le centre géométrique, 1 contour / seconde sur 30 secondes). b) et b') motilité des cellules correspondantes pendant l'application de la drogue. c) Déplacement quadratique moyen (les triangles correspondent à la limite supérieure de la barre d'erreur). En bleu : cellule avant l'application de la drogue ; en rouge : cellule pendant l'application de la drogue.

III.E En simplifiant la géométrie, on obtient une régularisation des protrusions

Une limite des expériences décrites précédemment dans ce chapitre III est que leur interprétation reste relativement qualitative (déplacement plus ou moins important du centre de masse, déformabilité plus ou moins grande du contour cellulaire, ...), ceci en raison de la dispersion intrinsèque entre protrusions (cf. section II.D.4 et figure II.31) qui ne permet pas, par exemple, de caractériser la migration par une périodicité protrusive bien définie.

Une explication de cette dispersion relative est que *E. histolytica* présente une morphologie très dynamique (cf. par exemple figure I.26), laquelle influence à son tour le développement des protrusions⁸ et conduit ainsi à une hétérogénéité parmi les protrusions développées, d'où un certain aspect « chaotique » dans la statistique protrusive.

Pour limiter cette variabilité morphologique, nous avons donc cherché à simplifier la géométrie, en vue d'obtenir un comportement protrusif modélisable ; nous avons ainsi testé diverses méthodes de confinement, chacune ayant ses propres avantages et inconvénients :

- en emprisonnant les cellules dans un gel afin de leur imposer une géomé-

⁸voir par exemple la discussion section II.F.3 sur les départs protrusifs rapides en zone concave.

trie persistante (section III.E.1).

- en les confinant entre deux lamelles de verre pour les placer dans un environnement bidimensionnel (section III.E.2).
- par confinement dans un microcanal (section III.E.3).
- par manipulation avec une micropipette (section III.E.4).

L'approche la plus fructueuse s'est révélée être l'utilisation des micropipettes, dont nous détaillons les débouchés en terme de modélisation section III.E.4.c.

III.E.1 Confinement dans des hydrogels

L'utilisation des hydrogels, parmi lesquels l'acrylamide (section III.E.1.a) et l'agarose (section III.E.1.b), s'est répandue en biologie en raison notamment de leur biocompatibilité, leur malléabilité et leurs propriétés viscoélastiques proches de tissus physiologiques mous ; de plus, il est possible de faire varier la rigidité des gels en adaptant la concentration en monomères ou la proportion de réticulant ; et enfin, ces gels sont poreux (à la différence du PDMS par exemple), ce qui permet une modification des conditions expérimentale par diffusion de drogues ou autres constituants à travers le gel. Notre idée était ici, en confinant des cellules dans des gels, d'imposer à la cellule une configuration géométrique persistante, dans l'espoir de générer ainsi des événements protrusifs reproductibles.

III.E.1.a Confinement par un gel d'acrylamide

Au cours de nos premiers tests, nous avons cherché à polymériser le gel autour des cellules. Pour cela, nous avons utilisé une polymérisation induite par la lumière (absorbeur : rose Bengale, qui permet une polymérisation à la lumière ambiante ou en lumière blanche). Malheureusement il s'est très vite avéré que la solution utilisée pour la polymérisation (acrylamide / bisacrylamide / tri-éthanol amine / rose bengale) n'était physiologiquement pas compatible avec des cellules vivantes et causait, *a minima*, un choc osmotique trop important aux cellules.

Une alternative est de polymériser le gel seul dans un premier temps, puis d'y inclure les cellules. La maille du gel étant bien inférieure à la dimension des cellules (de l'ordre de la centaine de nanomètres⁹), nous avons tenté « d'injecter » mécaniquement des cellules dans le gel, sans résultat concluant (l'injection mécanique déchire le gel et les cellules se retrouvent dans des fissures ou des poches larges, soit un confinement plutôt moins bon et surtout beaucoup moins bien maîtrisé que le confinement 2D que nous décrirons section III.E.2).

⁹le réticulant est dans un rapport de 1 à 29 par rapport aux monomères dans nos solutions, or 4 monomères = 10 nanomètres, soit une taille typique de maille du gel comprise entre 50 et 100 nm.

Une dernière utilisation que nous avons testée est de polymériser un gel d'acrylamide sur un moule en silicium comportant des motifs géométriques ; l'acrylamide polymérisé comporte alors des « puits » de géométrie bien contrôlée (principe de fabrication décrit figure III.15), dans lesquels on peut espérer pouvoir emprisonner des cellules (collaboration Amsha Proag - équipe Matthieu Piel, institut Curie, UMR 144). Mais en pratique, nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants, pour les raisons suivantes : les amibes ne se placent pas spontanément dans les puits (la gravité est insuffisante pour les y pousser, et on a vu section II.B.2 que nous ne disposons pas à l'heure actuelle de traitements de surface permettant de les confiner spatialement) ; il faut donc les pousser mécaniquement dans les puits, mais lorsqu'on presse le gel sur un tapis cellulaire, sa porosité entraîne un flux qui chasse les cellules. Nous n'avons pas poursuivi le développement pour les amibes, mais l'équipe de Matthieu Piel a poursuivi pour des cellules épithéliales dont on peut imposer la localisation par des traitements de surface (fibronectine notamment).

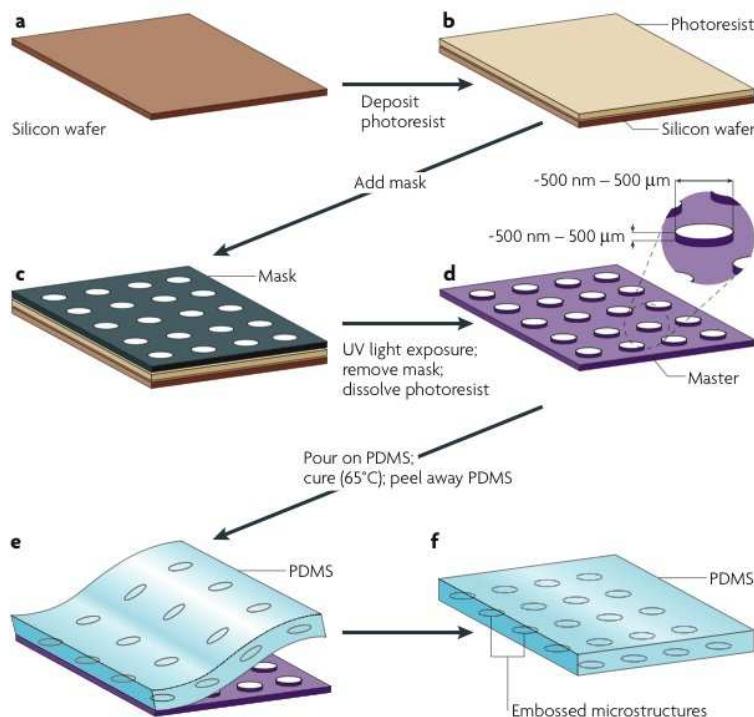


FIG. III.15: Principe de fabrication de puits, ici pour du PDMS (mais le principe est similaire pour la fabrication de structures en polyacrylamide). Figure extraite de [Weibel *et al.*, 2007]. a-b Une résine photosensible est déposée sur un wafer de silicium. c. Un masque optique est placé au contact de la résine. d. Illumination UV qui entraîne une réaction des zones non protégées de la résine ; un solvant organique permet ensuite de dissoudre et enlever les parties de résine non polymérisée. On obtient ainsi des motifs en relief correspondant au dessin du masque optique. e. Du PDMS est coulé sur le moule, puis polymérisé et enlevé. f. Le résultat est un morceau de PDMS avec des microstructures dont la profondeur est déterminée par l'épaisseur de résine initiale, et dont les formes correspondent au masque optique.

III.E.1.b Confinement par un gel d'agarose, avec polymérisation induite par la température

Différents types d'agarose sont disponibles commercialement, avec diverses températures de gélification ; l'utilisation d'un agarose de type I, ayant une température de transition de 36°C, peut permettre de mélanger l'agarose chaud encore non gélifié avec des cellules, puis après gélification d'observer le tout à une température physiologique de 37°C (utilisé par [Ahearne *et al.*, 2005] avec des kératocytes) ; en variant la concentration en agarose, des hydrogels ayant des modules d'Young compris entre 5 et 20 kPa peuvent être obtenus.

Nous n'avons eu le temps que pour quelques expériences préliminaires avec cette technique ; la difficulté principale concerne le contrôle de la température lors du mélange entre agarose chaud et cellules : en effet, le mélange doit se faire à une température inférieure à 40°C pour rester dans des conditions physiologiques acceptables, mais supérieure à 36°C durant un laps de temps suffisant pour permettre à la solution de s'homogénéiser avant gélification ; faute d'un contrôle suffisant de cette rampe décroissante de température, la gélification s'opère avant homogénéisation du mélange et les cellules se trouvent dans des poches larges de liquide.

III.E.2 Confinement 2D

Lorsque l'on confine les cellules à 2 dimensions (entre 2 lamelles de verre, voir figure III.16), leur motilité est impactée : les « flots » précédemment décrits section II.D.4 disparaissent au profit de protrusions plus petites (et qui, en contrepartie d'une taille réduite, sont plus fréquentes). L'augmentation des contraintes visqueuses dues à la proximité des deux surfaces de verre peut être un élément d'explication de ce changement de motilité.

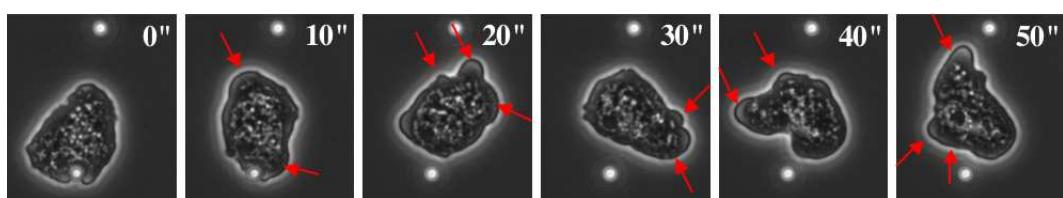


FIG. III.16: Motilité d'une amibe confinée entre deux lamelles de verre. La hauteur de confinement est déterminée par la dimension des billes intercalantes utilisées (ici, des billes de 7 microns, correspondant aux spots blancs sur les images).

Ainsi, ce confinement à 2 dimensions restreint la variabilité des protrusions, sans pour autant aboutir à une périodicité protractrice vraiment meilleure ; signalons également qu'un inconvénient majeur de ce dispositif est l'impossibilité de modifier les conditions environnementales (il est très difficile d'imaginer un changement du milieu pour tester l'effet d'une drogue, par exemple...).

III.E.3 Confinement dans un microcanal

III.E.3.a Principe

L'utilisation combinée de techniques de lithographie douce et de microfluidique permet de créer des chambres en élastomère de PDMS¹⁰, contenant des canaux de taille micrométrique et de forme contrôlée (cf. schéma III.17) ; ceci permet un confinement cellulaire, par exemple de levures ([Terenna *et al.*, 2008]) ou de cellules dendritiques ([Faure-Andre *et al.*, 2008]). Un avantage du système est la parallélisation possible de plusieurs expériences, par une conception appropriée des canaux. Il se trouve également que le PDMS est optiquement transparent, ce qui facilite grandement l'observation des cellules confinées : ainsi, l'observation en lumière transmise simple ou en contraste de phase donne des résultats très corrects. La fabrication des microcanaux décrites dans cette section a pu être faite grâce à une collaboration avec Matthieu Piel (Institut Curie, UMR 144).

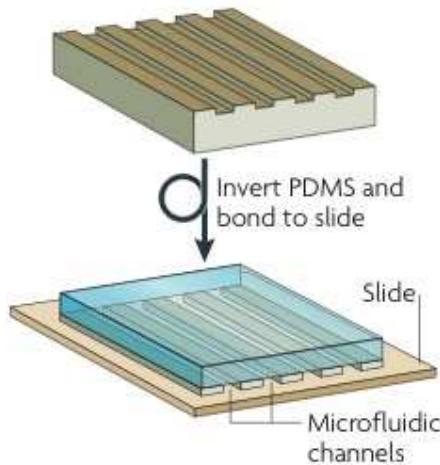


FIG. III.17: Principe de fabrication de microcanaux. Le moule est fabriqué de manière similaire à la description de la figure III.15, puis les canaux sont collés sur une surface en verre par simple contact après passage au plasma (repris de [Weibel *et al.*, 2007]).

III.E.3.b Expériences

Le premier schéma de canaux que nous avons testé consistait en une quinzaine de canaux en parallèle, de hauteur fixe (7 microns) et de largeur variable de canal en canal (de quelques microns de large jusqu'à une trentaine) : l'objectif était de déterminer quelle était la largeur de canal la mieux adaptée en terme de confinement. Les conclusions en ont été que la taille de canal pertinente pour les amibes correspondait à une section de l'ordre de 10-15 microns ;

¹⁰polydiméthylsiloxane.

en effet, avec quelques microns de large seulement, l'espace est insuffisant pour permettre aux amibes de pénétrer dans les canaux ; et avec une largeur atteignant 25-30 microns, le confinement latéral est trop faible, et l'on ne confine pas mieux que ce qu'on avait fait à 2 dimensions au paragraphe III.E.2.

La figure III.18 présente une amibe confinée dans un canal de section 10x10 microns : les probabilités d'occurrence des protrusions sont équilibrées entre les 2 extrémités cellulaires, mais la régularité des protrusions en terme de morphologie et de périodicité n'est pas autant au rendez-vous qu'on pourrait l'espérer, avec notamment des protrusions n'occupant qu'une partie de la largeur du canal : une explication à cela est très probablement l'importance de la résistance visqueuse entraînée par le confinement : en effet la perméabilité du PDMS à l'eau est faible, et donc pour développer une protrusion ayant la même section que le canal, il faudrait que l'amibe « pousse » toute la colonne d'eau devant elle, alors qu'il est bien plus favorable de développer une protrusion de largeur plus réduite qui permettra des flux latéraux compensatoires (voir schéma figure III.19).

Nous avons également pu observer certains cas de « mouvement dirigé » : par exemple figure III.20.a, où l'on voit une amibe avoir un mouvement dirigé pendant plus d'une centaine de microns, avant de faire demi-tour pour repartir en arrière sur des dizaines de microns ; ce ne semble pas être l'effet d'une géométrie particulière de canal, puisque pour d'autres cellules les changements de direction sont beaucoup plus fréquents. Ce pourrait donc être un effet de variabilité entre cellules de la cinétique d'augmentation du nombre de liens cytosquelette-membrane, comme nous le discutons section II.F.3.

Le confinement et les effets de pression engendrés lors des déplacements cellulaires peuvent également entraîner des effets collectifs, par exemple figure III.20.b où l'on voit deux amibes proches avoir un mouvement coordonné : en effet, on peut penser qu'une cellule qui avance tend à créer une dépression derrière elle, de sorte que cela facilite la création d'un bleb à l'avant de l'autre cellule ; ou de façon équivalente, que la cellule « suiveuse », en avançant, crée une surpression à l'arrière de la cellule de tête qui défavorise la création d'un bleb de ce côté.

Ce phénomène de « coordination » entre cellules proches indique également que dès qu'il y a plus d'une cellule dans un canal, les cellules sont capables de s'influencer mutuellement ; hors, la longueur des canaux atteignait couramment quelques millimètres sur les modèles que nous avons utilisé, donc si l'on ne prend pas de précautions particulières il peut tout à fait y avoir des amibes présentes dans le même canal, mais hors du champ de l'imagerie, qui « faussent » la statistique protrusive.

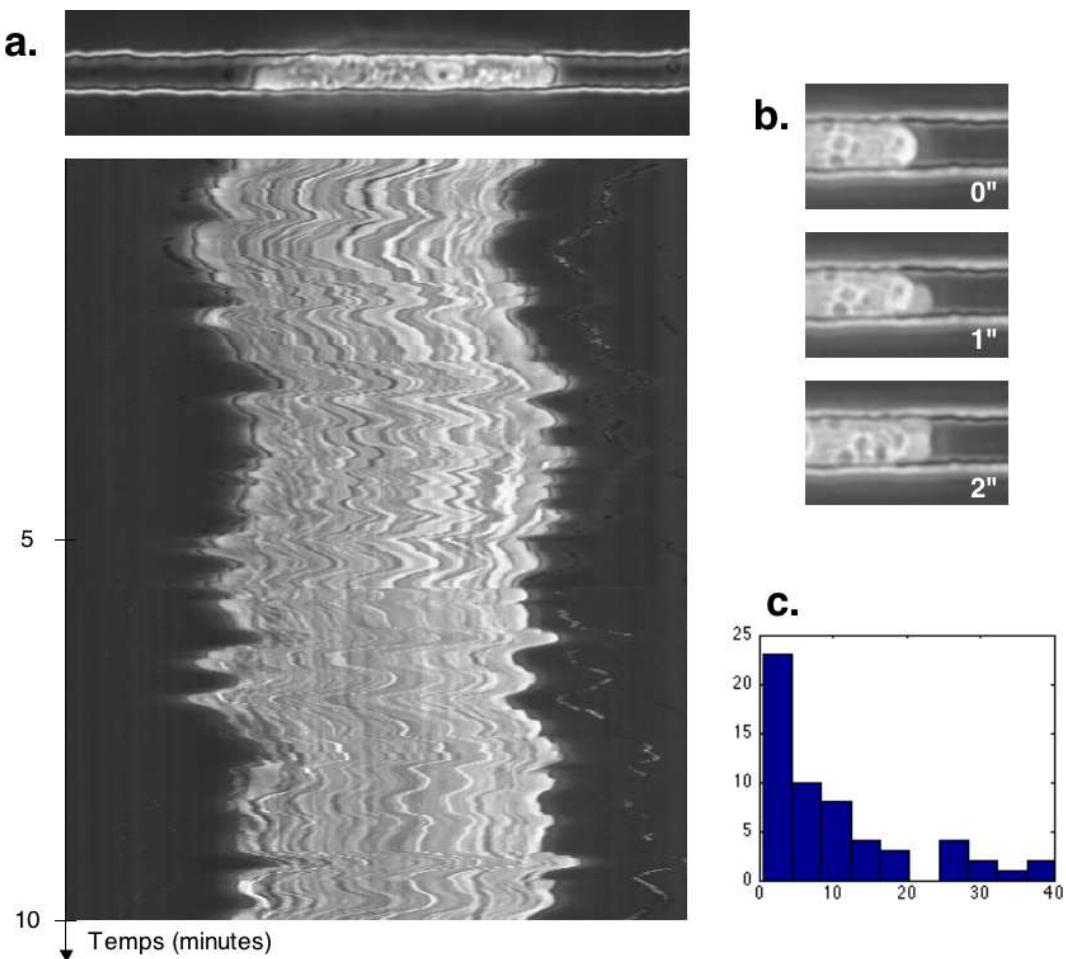


FIG. III.18: a.) Amibe dans un canal microfluidique de section 10x10 microns ; le kymographe montre l'occurrence de protrusions réparties de façon statistiquement équilibrée aux 2 extrémités cellulaires libres. b.) On observe fréquemment des protrusions qui n'occupent pas toute la largeur du canal : ici deux protrusions successives côté à côté. c.) Histogramme des intervalles de temps entre départs protrusifs : il n'y a pas de fréquence caractéristique bien déterminée, vu la persistance d'hétérogénéités parmi les protrusions.

III.E.3.c Conclusion

Nous avons donc vu que l'utilisation « standard » des microcanaux était insuffisante pour obtenir une périodicité bien définie des protrusions (figure III.18.c). Une piste pour améliorer cela pourrait être de « biaiser » le blebbing en imposant une légère différence de pression entre les deux extrémités du canal, ce qui pourrait permettre par une pression légèrement négative à l'avant de la cellule de limiter les effets de résistance visqueuse, qui sont probablement responsables de cette absence de régularité protrusive. Il se trouve que nous n'avons pas poursuivi les expériences en ce sens, puisque nous développions en parallèle la technique de micropipettes (section III.E.4), qui s'est avérée fructueuse la première.

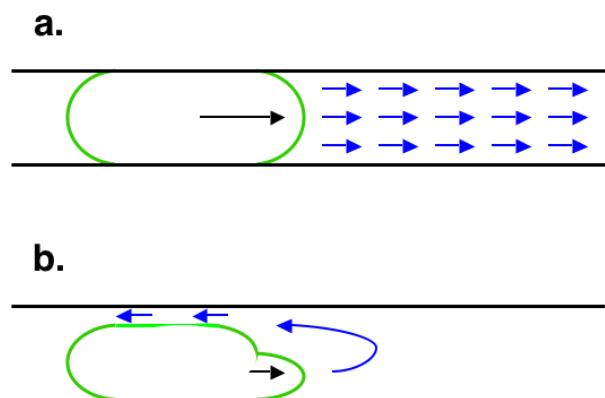


FIG. III.19: a. Expansion d'une protrusion occupant toute la largeur du canal : la résistance visqueuse est forte, vu qu'il faut déplacer toute la colonne d'eau devant la cellule. b. Expansion d'une protrusion n'occupant qu'une fraction de la largeur du canal : la résistance visqueuse est bien plus faible, car des flux latéraux peuvent se produire.

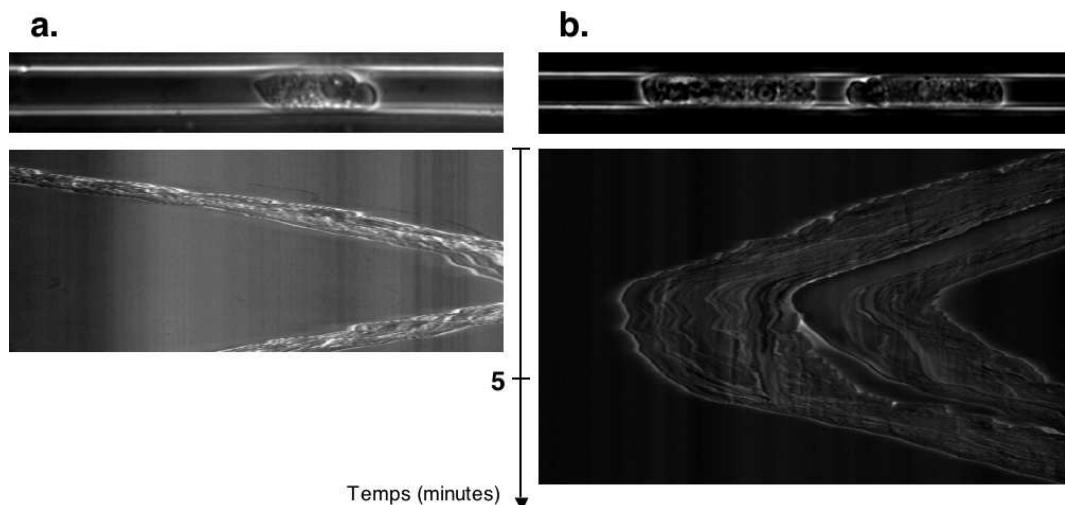


FIG. III.20: Deux cas particuliers de cellules confinées dans des canaux microfluidiques (ici, canaux d'approximativement 15 microns de large et 7 microns de haut). a. Déplacement cellulaire directionnel sur de longues distances. b. Deux cellules proches montrant un mouvement coordonné.

Les microcanaux présentent ainsi un nombre certains d'avantages, mais également quelques inconvénients, notamment :

- une géométrie de section carrée ou rectangulaire, moins proche de la morphologie cellulaire que la section circulaire d'une micropipette.
- pour les canaux en PDMS, il est également difficile d'envisager observer une même cellule en différentes conditions (drogues, ...) vu la très faible perméabilité à l'eau du PDMS, à moins d'envisager un design spécial utilisant des mini-canaux d'irrigation latéraux augmentant la perméabilité globale du dispositif; une autre solution serait d'employer des canaux peu épais en hydrogels (agar ou acrylamide), mais on est alors confronté

à d'autres problèmes expérimentaux (notamment la technique de collage des canaux sur le support, car la fonctionnalisation au plasma ne fonctionne pas pour les hydrogels...).

III.E.4 Régularisation par manipulation avec micropipettes

III.E.4.a Régimes dynamiques théoriques

Dans une expérience d'aspiration avec micropipette (voir le schéma de la figure III.21 pour les notations utilisées par la suite), on peut distinguer 2 étapes dynamiques : la croissance de la protrusion, éventuellement suivie de sa rétraction. La phase de croissance initiale peut se produire suite à une disjonction de la membrane par rapport au cytosquelette, ou avec un cytosquelette restant attaché à la membrane étiré sous l'action seule de la dépression dans la pipette ; la phase de rétraction, elle, est due à l'activité contractile du cytosquelette.

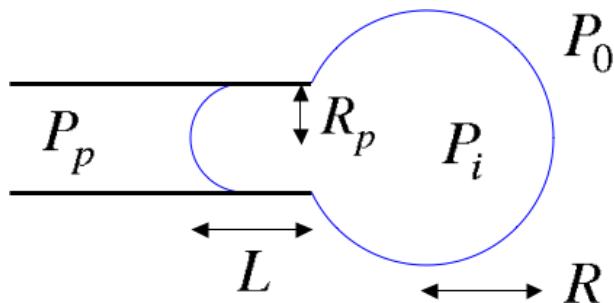


FIG. III.21: Schéma d'aspiration d'une cellule par micropipette, avec notations employées au fil du chapitre.

Pour distinguer les différents régimes dynamiques possibles, nous définissons ici les paramètres qui vont être utilisés pour tracer le diagramme de phase ; par simplicité, on se ramène à des épaisseurs caractéristiques de cortex (rappelons que $h(\vec{r}, t)$ est l'épaisseur locale du cortex à l'instant t) :

- h_{stat} est l'épaisseur qu'aurait le cortex à l'état stationnaire (si l'on définit v_p et v_d les vitesses respectives de polymérisation et de dépolymérisation en épaisseur dans le gel d'actine, alors h_{stat} correspond à $v_p = v_d(h_{stat})$).
- h_b est l'épaisseur critique du cortex dans la micropipette pour laquelle la pression f sur les liens cytosquelette-membrane atteint la pression critique f^* de disjonction¹¹ :

$$h_b \simeq \frac{R_p}{\sigma_{ms}\xi^2} f^*$$

¹¹avec ξ la périodicité spatiale des liens cytosquelette-membrane et σ_{ms} le stress dû aux myosines.

- h_s est l'épaisseur de cortex nécessaire pour arrêter l'expansion de la protrusion dans la pipette. Pour son expression exacte, qui est un peu complexe et qu'on ne détaillera donc pas ici, se reporter à [Brugues, 2008].

En fonction des valeurs respectives des paramètres h_{stat} , h_b et h_s , on a donc différents comportements dynamiques, détaillés dans le diagramme de phase de la figure III.22 :

- si $h_b > h_{stat} > h_s$: une première protrusion est étirée via l'aspiration initiale de la micropipette, avant d'être rétractée lorsque h atteint la valeur h_s (ce qui se produit nécessairement vu que $h_s < h_{stat}$), et la rétraction est définitive (car $h_{stat} < h_b$) : on a donc un régime dit de « rétraction ».
- si $h_{stat} > h_b > h_s$: la protrusion initiale est d'abord rétracté (car $h_s < (h_b, h_{stat})$) avant une nouvelle protrusion par disjonction lorsque h atteint la valeur h_b (ce qui se produit immanquablement car $h_b < h_{stat}$), et le cycle se répète : on a cette fois un régime d'« oscillations ».
- si $h_s > h_{stat} > h_b$: la protrusion n'est jamais rétractée vu que $h_{stat} < h_s$; mais comme $h_b < h_{stat}$, on observe des disjonctions, on a donc un régime « saltatoire ».
- si $h_{stat} < (h_b, h_s)$: la protrusion n'est jamais rétractée ($h_{stat} < h_s$), et le seuil de disjonction n'est jamais atteint ($h_{stat} < h_b$) : on a donc une progression continue de la protrusion, dans un régime qu'on pourrait qualifier de « flot stationnaire ».

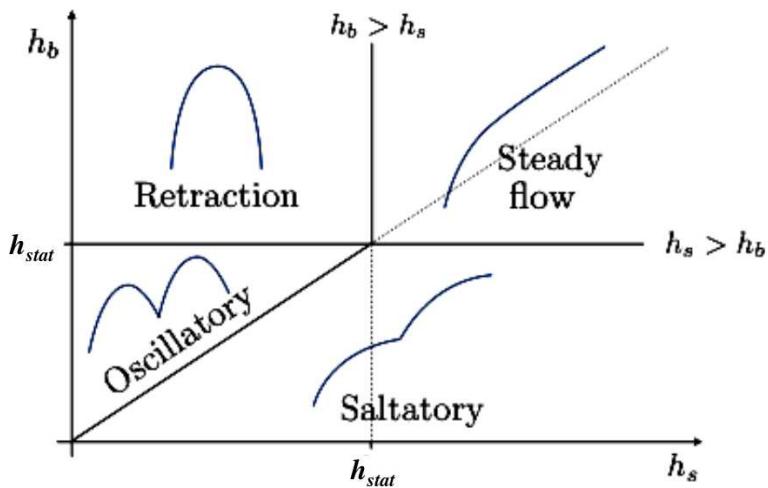


FIG. III.22: Diagramme de phase des différents régimes dynamiques prédis pour des expériences d'aspiration de cellules par micropipettes (schéma adapté de [Brugues, 2008], avec une valeur arbitraire de h_{stat}).

Parmi ces divers régimes, le régime d'« oscillations » est de loin le plus intéressant puisque sa dynamique périodique est la plus contraignante par rapport au modèle ; ainsi, par une modélisation des expériences, on peut espérer remonter aux valeurs expérimentales des divers paramètres ; de plus, pour peu que l'on puisse observer ce régime sur un laps de temps suffisamment long, on

peut imaginer soumettre la même cellule à des traitements divers (drogues, ...) pour voir si le changement de comportement dynamique correspond quantitativement aux prévisions.

III.E.4.b Expériences

Les expériences ont été effectuées avec l'aide initiale de Pierre Nassoy (Institut Curie, UMR 168) et sur son dispositif expérimental. Il s'est d'ailleurs avéré assez complexe d'adapter le dispositif pour le rendre compatible avec des conditions physiologiques acceptables pour les amibes : après la mise au point d'un mécanisme de thermostatation de l'objectif, pour maintenir l'échantillon à 37°C, et l'utilisation d'huile minérale, pour éviter l'évaporation et limiter l'oxygénation du milieu d'observation, nous avons obtenu une viabilité cellulaire supérieure à l'heure, permettant la manipulation successive de plusieurs amibes au cours de la même séance expérimentale.

Parmi la gamme de cellules manipulées, nous avons pu observer les différents régimes prédits (ce qui indique que la simple variabilité cellulaire des paramètres h_s , h_b et h_{stat} est suffisante pour avoir dans une même population des cellules correspondant aux différentes zones du diagramme). Les régimes de rétraction et de flot étant relativement peu informatifs, nous ne présentons ici de façon détaillée que les régimes saltatoires (déjà illustré préalablement figure III.8), et le régime oscillatoire.

Un exemple de régime oscillatoire est présenté figure III.23 : conformément aux prédictions de la section III.E.4.a, on observe des cycles disjonction / expansion / repolymérisation / rétraction / ..., qui présentent une périodicité bien définie. Nous discutons plus avant l'analyse théorique de ce régime dans la section III.E.4.c.

III.E.4.c Analyse par modélisation du régime oscillatoire

L'analyse du régime oscillatoire par un modèle quantitatif dédié (cf. [Brugues, 2008]) s'est avérée fructueuse, avec un très bon accord entre la dynamique protrusive oscillatoire observée et la modélisation (voir figure III.24), ce qui constitue une validation quantitative de notre modèle de motilité par disjonction. Les valeurs des paramètres utilisés dans les simulations sont conformes aux ordres de grandeur attendus, avec pour la figure III.24 une pression d'aspiration ΔP de 400 Pa (fixée par l'expérience), une vitesse de polymérisation v_p de 50 nm s⁻¹ et une épaisseur de cortex au moment du détachement $h_b = 600$ nm.

Une prédition théorique des travaux de [Brugues, 2008] était que, pour le régime d'oscillations, la fréquence était directement reliée au diamètre de la pipette. En pratique, nous n'avons pas pu tester cette hypothèse, car la

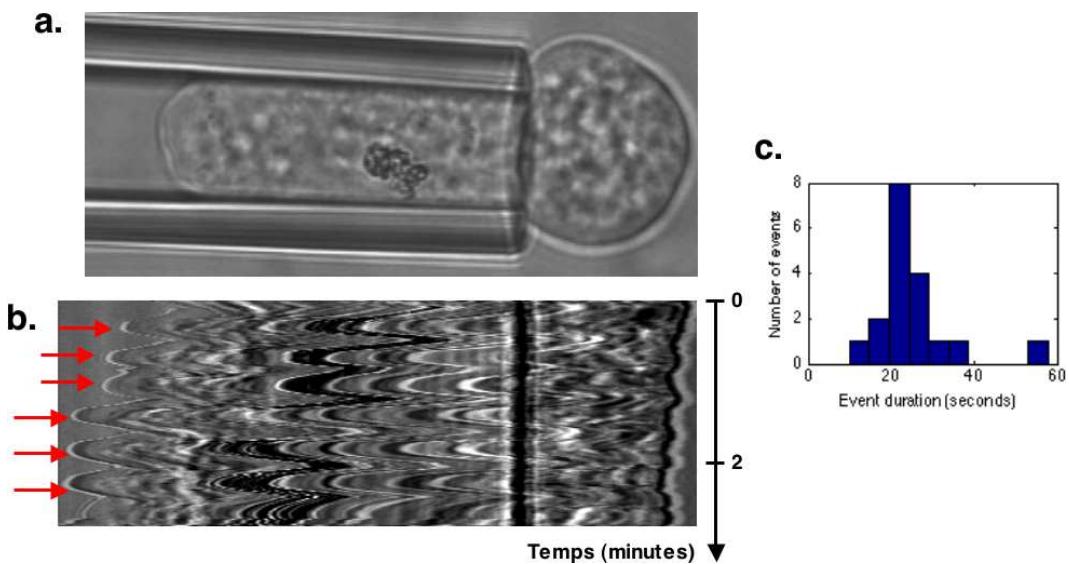


FIG. III.23: Exemple de régime dynamique d'oscillations dans une micropipette. Ce régime n'est pas très fréquent, nous ne l'avons observé que 5 fois sur plus d'une cinquantaine de tentatives. a. Photo de la cellule partiellement aspirée. b. Kymographe montrant les cycles successifs ; les flèches rouges pointent chacune sur une protrusion. c. Histogramme des durées des événements protrusifs pour l'exemple considéré, on observe ici une période d'oscillation bien définie comprise entre 20 et 25 secondes (lors d'autres expériences, des valeurs de périodes de l'ordre de 10-15 secondes ont pu être également pu être observées).

gamme de rayons de pipettes utilisables s'est avérée assez limitée pour des raisons expérimentales :

- si le diamètre de la pipette est trop petit (par exemple de l'ordre de 5 microns) :
 - aux aspirations faibles, la force d'aspiration exercée est insuffisante pour maintenir la cellule dans la pipette¹², ce qui conduit parfois à des cellules se promenant sur le bord extérieur de la pipette... La force exercée par la pipette peut aussi s'avérer trop faible pour décoller la cellule de son substrat, auquel cas la cellule échappe à la pipette simplement en s'aidant de l'adhésion au substrat.
 - en augmentant la pression d'aspiration, on tend à détacher des portions de membrane, immédiatement aspirées sous forme de vésicules dans la pipette.
- pour des diamètres de pipette trop grands (à partir de 12-13 microns), la cellule est immédiatement aspirée en entier à l'intérieur de la pipette.

En pratique, les résultats obtenus l'ont donc été avec des diamètres de pipette intermédiaires, typiquement 10 microns.

Hélas, contrairement à nos espoirs initiaux, il n'a pas été possible d'utiliser cette modélisation pour mesurer les paramètres internes sur une même cel-

¹²en effet cette force est proportionnelle à R_p^2 .

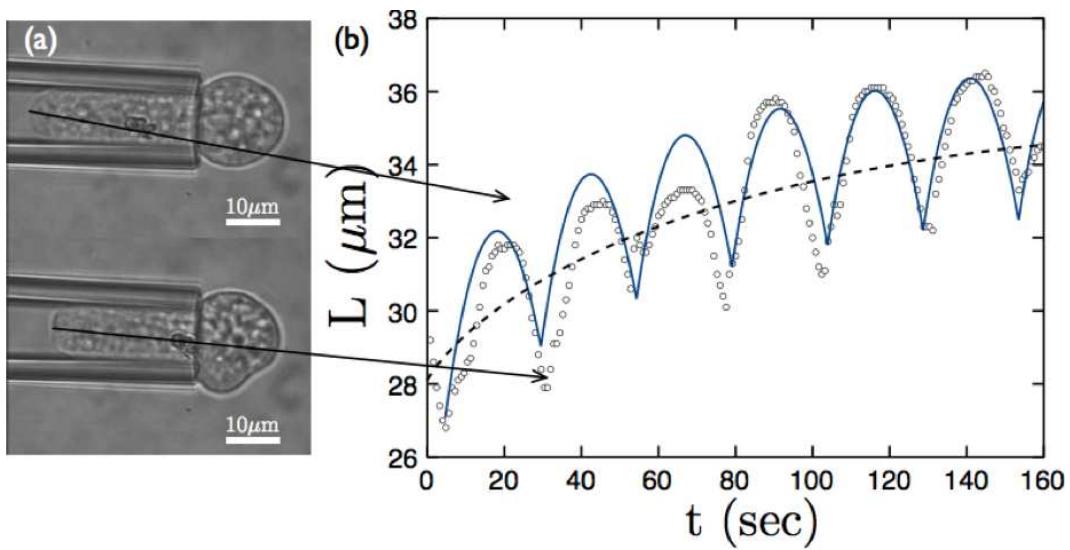


FIG. III.24: Analyse du régime oscillatoire (schéma repris de [Brugues, 2008]). Les cercles représentent les données expérimentales, le trait plein la simulation (avec $\Delta P = 400 \text{ Pa}$, $v_p = 50 \text{ nm s}^{-1}$ et $h_b = 600 \text{ nm}$) ; le trait pointillé représente l'avancement moyen de la cellule dans la pipette, ce n'est ici pas une constante car l'analyse est faite ici sur les premiers cycles d'oscillation et la valeur stationnaire de l'avancement n'est pas encore atteinte.

lule dans deux conditions différentes (par exemple avant et après ajout d'une drogue limitant l'activité contractile), car ce régime oscillatoire n'est observé que sur une durée limitée (quelques minutes), insuffisante pour permettre deux mesures successives sur une même cellule, et donc un découplage des valeurs des paramètres f^* (pression critique de disjonction), ξ (périodicité spatiale des liens cytosquelette-membrane) et σ_{ms} (stress dû aux myosines).

Chapitre IV

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a donc porté sur la migration cellulaire par disjonction cytosquelette-membrane : nous avons montré que chez *Entamoeba histolytica*, la contraction corticale (section III.C) crée une pression croissante sur les liens cytosquelette-membrane, relaxée lorsqu'une disjonction se produit ; la poursuite de la contraction permet, par pression hydrostatique interne, l'expansion des protrusions ; et la dynamique biochimique du cytosquelette (section III.D) provoque une repolymérisation du cortex (section II.E), qui met fin à la protrusion, permet de réaccumuler un stress contractile global et entraîne l'apparition ultérieure de nouvelles protrusions (sections II.C, II.D et modèle général section II.F).

La migration par motilité sur un substrat suppose de développer des forces d'adhésion pour permettre l'avancée effective de la cellule, dans des conditions hydrodynamiques où l'inertie est négligeable devant la dissipation visqueuse. Nous avons montré que dans la motilité par disjonction d'*E. histolytica*, le substrat n'est pas utilisé par la protrusion pour se développer (sections II.B.1 et II.B.3), ce qui au passage est un moyen de limiter la friction ; le rôle du substrat n'est donc que de servir de point d'appui ultérieur pour stabiliser les protrusions, les processus d'adhésion mis en oeuvre par l'amibe semblant être non spécifiques vu l'absence de phénotype particulier sur des surfaces aux propriétés variées (section II.B.2). Dans ce contexte de motilité par disjonction, le couplage entre protrusions développées par pression hydrostatique interne, et adhésions faibles non spécifiques, apparaît comme un moyen simple et robuste d'obtenir un déplacement sur tout type de substrat ; ainsi la rupture des adhésions ne nécessite pas de faire appel à une régulation biochimique complexe, comme dans le cas d'adhésions fortes médiées par des complexes focaux : la simple contraction corticale permet de produire une tension à l'interface avec le substrat, qui provoque le détachement de la membrane par rapport au support, corrélativement au développement des protrusions (schéma II.9.d).

Dans le contexte étudié ici où la migration ne fait pas appel à une polarisation persistante, l'efficacité à explorer l'espace est liée à plusieurs facteurs :

- présence d'une seule protrusion à la fois, de taille suffisante, pour que ladite protrusion permette un déplacement significatif de la cellule.
- rapidité de développement des protrusions,
- fréquence d'apparition de protrusions nouvelles.

Dans notre modèle, la présence d'une seule protrusion à la fois s'explique par le rôle joué par la pression hydrostatique dans un contexte de cytoplasme visqueux : dans le cas où plusieurs protrusions sont présentes en même temps, l'équilibre global de pression hydrostatique va entraîner la progression du bord cellulaire là où la résistance mécanique est la plus faible sur tout le pourtour cellulaire, ce qui favorise l'une des protrusions : nous avons testé artificiellement ce point en montrant qu'une relaxation locale de pression par électroporation (section III.B.2) a un effet d'inhibition global. Les vitesses d'expansion des protrusions, plus élevées que ce qui est permis par polymérisation d'actine seule, viennent de ce que la force protrusive est due à une pression hydrostatique créée par contraction corticale : dans ce contexte, la vitesse d'expansion résulte d'un compromis entre le travail mécanique fourni par la contraction du cortex, et la résistance visqueuse aux flux cytoplasmiques lors de l'expansion de la protrusion, ces processus n'étant pas limités par une vitesse de polymérisation. Enfin, l'apparition rapide de nouvelles protrusions s'explique par la dynamique biochimique rapide du cortex dans notre système, qui permet un effondrement et une repolymérisation du cortex sur une échelle de temps de l'ordre d'une dizaine de secondes.

Une de nos préoccupations récurrente dans ce travail a été de confronter quantitativement nos prédictions sur la motilité par disjonction, via un modèle physique aussi simple que possible, avec les observations expérimentales. Une difficulté majeure est l'aspect stochastique de la marche aléatoire des cellules : nous avons observé une dispersion intrinsèque entre protrusions (section II.D.4 et figure II.31) qui ne permet pas, par exemple, de caractériser la migration par une périodicité protrusive bien définie ; ceci restreint l'analyse à une comparaison qualitative des variations des observables du mouvement cellulaire (déplacement du centre de masse, déformations du contour cellulaire...). L'approche que nous avons adoptée pour contourner ce problème a été de nous nous placer dans des conditions de géométrie simplifiée, avec pour but d'obtenir un comportement plus régulier, modélisable quantitativement (section III.E) ; le résultat le plus probant a été l'observation d'un régime oscillatoire régulier via une manipulation par micropipette (section III.E.4), dont l'analyse par un modèle quantitatif dédié (section III.E.4.c et [Brugues, 2008]) a montré un très bon accord entre la dynamique protrusive oscillatoire observée et la modélisation, ce qui constitue une validation quantitative de notre modèle de motilité par disjonction. Une limite expérimentale a hélas été l'impossibilité d'observer ce régime oscillatoire sur une durée suffisante, pour permettre de varier les conditions expérimentales sur une même cellule et donc mesurer les valeurs individuelles de tous les paramètres du modèle ; néanmoins nous pensons que cette approche ouvre des perspectives très prometteuses pour permettre une compréhension physique réellement quantitative des processus de motilité.

Un autre aspect notable de ce travail a été d'étudier d'un point de vue physique rigoureux le mode d'action de la pression osmotique (section III.A.2) : nous avons montré qu'il est nécessaire, pour interpréter correctement son action, de considérer à la fois le temps de relaxation du cortex et le temps typique associé à la perméabilité membranaire : à la lumière de ces résultats, un certain nombre d'expériences dans le domaine de la motilité cellulaire, utilisant la pression osmotique, doivent être réinterprétées (par exemple [Yoshida and Soldati, 2006]).

Une question que nous n'avons pu aborder que très partiellement, vu l'absence de données disponibles sur les partenaires moléculaires responsables de l'adhésion cytosquelette-membrane chez *E. histolytica*, est celle de la polarisation cellulaire dans le cadre de la motilité spontanée¹ par blebs : en effet, certains types cellulaires montrent un blebbing cellulaire spontané polarisé (par exemple les carcinosarcomes Walker décrits en section I.B.2.c), alors que pour *E. histolytica* il n'y a pas de directionnalité persistante. Il n'y a pas à ce jour dans la littérature de cadre conceptuel global pour expliquer le passage d'un type de polarisation à l'autre : nous pensons qu'il faut considérer les temps caractéristiques associés aux cinétiques suivantes :

- la cinétique d'augmentation de résistance mécanique du cortex reformé dans le bleb en cours de développement.
- la cinétique d'augmentation du nombre de liens avec la membrane dans le bleb en cours de développement.
- la cinétique de contraction.

Pour observer des blebs successifs non corrélés, notre hypothèse est que la cinétique d'augmentation des liens ne doit pas être limitante par rapport aux deux autres cinétiques (pour une discussion plus complète, voir section II.F.3) : vu l'absence de données moléculaires disponibles à ce jour chez *E. histolytica*, cette hypothèse n'a pas pu être testée, mais nous espérons qu'elle pourra l'être à l'avenir puisqu'il s'agit d'un élément-clé pour la compréhension de la motilité aléatoire par blebs ; en d'autres termes, nous proposons qu'une simple modification de la cinétique de la liaison cytosquelette-membrane puisse être un paramètre de contrôle entre motilité par blebs aléatoire et motilité par blebs dirigée.

De façon plus générale, ce travail s'inscrit dans une logique de compréhension physique quantitative des mécanismes de motilité cellulaire : nous avons été guidés par la conviction que malgré la complexité réelle des régulations biochimiques à l'oeuvre dans les cellules, des concepts physiques comme la notion d'instabilité dynamique, couplée aux notions usuelles de physique de la matière molle, sont pertinents pour améliorer notre compréhension d'un mécanisme aussi fascinant que le mouvement cellulaire, dans lequel les cellules créent inlassablement de nouvelles protrusions, avec une diversité sans cesse renouvelée, et dont la variété n'est en fait que le jeu d'une instabilité couplant les propriétés physiques et biochimiques.

¹par opposition à une motilité pilotée par chemotaxie.

Annexe A

Culture cellulaire

La souche cellulaire *Entamoeba histolytica* de référence est HM1-IMSS [Diamond, 1961]. Les cellules sont cultivées en milieu TY-SS3 complémenté, mais ne sont pas conservées au laboratoire plus de quelques jours, conformément aux dispositions d'hygiène et sécurité en vigueur pour notre salle de culture ; lorsque nécessaire, des échantillons d'amibes fraîches nous sont fournies hebdomadairement par nos collègues de l'institut Pasteur.

Juste avant les expériences, les cellules sont resuspendues en milieu TY-SS3 non complémenté.

Annexe B

Traitement d'images

B.1 Détail de l'analyse pour le suivi du contours cellulaire complet

B.1.1 Principe mis en oeuvre pour la segmentation d'images « ex nihilo »

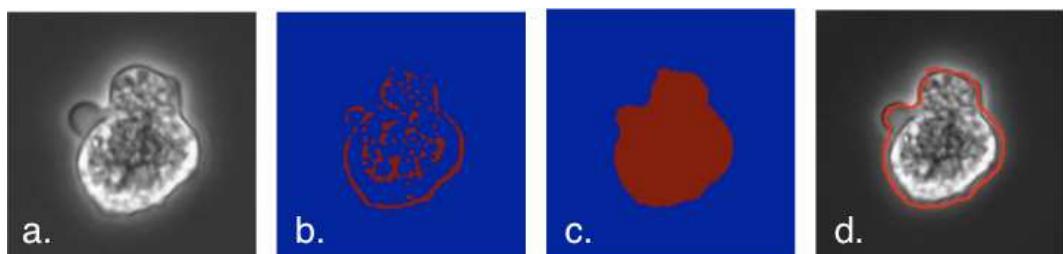


FIG. B.1: Exemple d'extraction du contours cellulaire. a). image initiale. b). image binarisée après filtrage pour faire ressortir les zones où se produisent des variations de niveaux de gris importantes. c). image après correctifs géométriques pour homogénéiser la forme obtenue. d). extraction des contours de l'image binaire précédente, représentés ici en rouge en superposition sur l'image initiale.

Le principe du traitement est, à partir d'une image en niveaux de gris (figure B.1.a), d'aboutir à une image « binaire » où le niveau 1 correspond par exemple à l'intérieur de l'amibe et le niveau 0 à l'extérieur (figure B.1.c).

Le traitement complet peut comprendre plusieurs sous-traitements :

1. filtrage de l'image (par exemple : pour éliminer certaines hautes fréquences spatiales).
2. filtrage pour améliorer le contraste (par ex., filtrage laplacien).

-
3. segmentation de l'image (par seuillage, ou méthodes plus sophistiquées : snakes, « intégration rapide de contours », ...).
 4. opérations géométriques sur l'image binaire obtenue (par exemple : ouvertures/fermetures, ...).

Une première approche testée a été l'utilisation d'algorithmes « tout intégrés » (consistant plus ou moins à utiliser directement l'étape 3 seule : par exemple, [Dufour *et al.*, 2005]). Les résultats n'ont pas été très concluants, la méthode utilisée ne semblant pas bien s'accommoder de nos images en contraste de phase (notamment : sensibilité importante aux paramètres d'initialisation...), la durée des traitements étant assez longue et les programmes étant difficilement adaptables à nos besoins propres.

Une seconde approche a donc été d'utiliser une méthode plus simple (moins « intégrée »...), utilisant une méthode de segmentation simpliste (seuillage : figure B.1.b), et nécessitant donc en contrepartie des étapes en amont et en aval :

- en amont une étape de filtrage simple adaptée à l'échelle des contours (étapes 1 et 2 simultanées), attribuant un poids nul aux zones uniformes, et un poids important aux zones présentant des variations de niveaux de gris importantes.
- en aval (étape 4), puisque la segmentation ne permet qu'une sélection de portions de contours (et notamment : pas l'intérieur des cellules, ou du moins de façon très hétérogène), il faut une opération morphologique pour « boucher les trous » dans l'intérieur de la cellule et avoir un contours plus ou moins homogène.

B.1.2 Principe d'extraction des contours à partir d'images binaires segmentées

A partir des images binaires segmentées, les contours sont obtenus en appliquant une fonction Matlab (*contourc*) qui permet d'extraire des lignes de niveau d'une image (figure B.1.d). Les points des lignes de niveau ont des valeurs demi-entières en coordonnées « pixels », c'est à dire que si l'on souhaite faire des calculs géométriques précis à partir du contours (calculer les tangentes en chaque point, par exemple), il faut auparavant « régulariser » le contour (voir section B.1.3).

B.1.3 Principe de « régularisation » d'une courbe

Considérons une courbe géométrique (suite de points) : si les coordonnées des points sont astreintes à des valeurs discrètes ET que l'espacement entre les points est du même ordre que la discréttisation, des artefacts risquent d'apparaître lors d'analyses géométriques (par ex. : considérer la tangente en un

point comme le vecteur unitaire sur l'axe M_iM_{i+1} va donner quelque chose de très bruité puisque lui-même très discrétilisé).

Pour simplifier, partons du principe que les N points constituant la courbe sont espacés de façon relativement homogène. On peut alors construire une courbe extraite, composée d'un point sur K , soit de N/K points ; les $N - N/K$ point manquants par rapport à la courbe de référence peuvent être approximés par une interpolation « spline ». Or, on peut construire K courbes extraites différentes de taille N/K (selon le choix d'origine), que l'on peut ramener par interpolation à K courbes de N points. Si l'on considère l'ensemble des i^{eme} points de chaque courbe, on est face à un nuage de points localisés autour d'une position moyenne (moyenne sur les différentes interpolations) : en prenant comme nouvelle courbe de référence la courbe constituée de ces positions moyennes, on se retrouve avec une courbe beaucoup plus « douce » que la courbe initiale. Le choix du paramètre K est bien sûr important : trop petit, l'effet de lissage n'est pas assez accentué ; trop grand, on risque de « gommer » des détails significatifs de la courbe de départ.

Une méthode alternative (plus simple mais abandonnée) consistait à moyenner la position de chaque point avec celle de ses voisins : mais l'inconvénient majeur de cette technique est que la courbe après traitement était décalée vers l'intérieur des portions courbes (la méthode d'interpolation a donc été mise au point pour s'affranchir de cet artefact).

B.1.4 Principe de reconstitution de trajectoires à partir de contours

A partir d'un contour, une fonction Matlab récupérée sur le web (*polygeom*) permet d'extraire le centre de masse du contours fermé considéré et l'aire enclose.

Pour la reconstitution de trajectoires, deux cas sont possibles :

- il n'y a qu'une seule cellule dans le champ, alors il suffit pour chaque image de considérer le contours le plus long (permet de s'affranchir des poussières parasites qui pourraient être segmentées aussi).
- s'il y a plusieurs cellules dans le champ : il faut reconstituer les différentes trajectoires.
 - on élimine les poussières et autres parasites en fixant une aire minimale au dessous de laquelle la « cellule » segmentée n'est pas considérée.
 - on raccorde alors « de proche en proche ». Pour éviter les problèmes aux bords, on fixe une distance minimale à laquelle la cellule doit être du bord. Pour éviter des raccords intempestifs de trajectoires si deux cellules se touchent, on fixe un seuil relatif déterminant la variation maximale d'aire admissible au cours d'une trajectoire. Pour éliminer les bouts de trajectoires aberrants résiduels (par exemple deux cellules accolées durant un temps bref), on fixe une longueur minimale en

dessous de laquelle on ne tiendra pas compte de la trajectoire.

B.2 Suivi de portions de contours à partir d'un bord initialisé par l'utilisateur

Pour certaines analyses sur des portions de contours, il a été nécessaire de mettre en oeuvre une méthode de détection alternative en deux temps :

1. tracé par l'utilisateur d'un contours de référence.
2. calculs par l'algorithme pour « suivre » ce contours au cours du temps par une méthode de corrélation locale.

Annexe C

Détails de l'analyse du déplacement du centre de masse : abscisse curviligne

L'analyse du déplacement du centre de masse en terme d'abscisse curviligne (et donc de façon corrélée, en terme de vitesse instantanée), fait apparaître des artefacts rhéodibitoires pour peu que le bruit sur la localisation de ce centre ne soit pas négligeable. En pratique, le bruit est notable : nous présentons ici une méthode permettant de filtrer ce bruit et permettant d'obtenir des mesures d'abscisses curvilignes, et de donc ultérieurement de vitesse de déplacement du centre cellulaire, qui soient pertinents.

Un exemple d'évolution de l'abscisse curviligne d'une trajectoire cellulaire en fonction du temps est montré figure C.1.

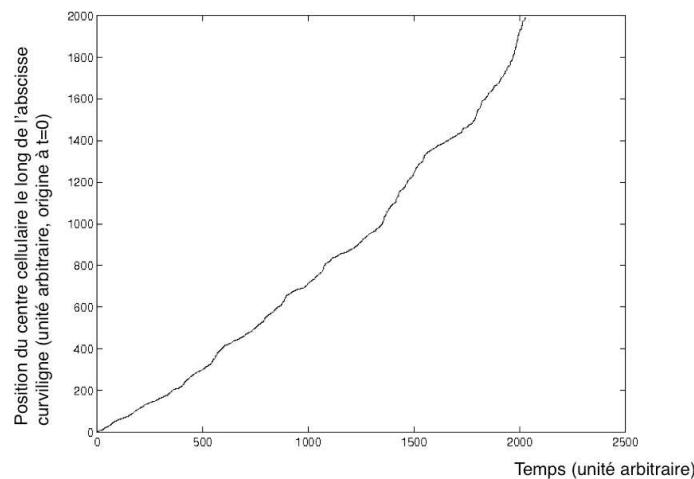


FIG. C.1: Exemple d'évolution de l'abscisse curviligne d'une trajectoire en fonction du temps, données brutes bruitées.

La figure C.1 assez peu significative, on n'y retrouve pas comme attendu une alternance d'expansions rapides et de plateaux. En effet, l'analyse des contours cellulaires est entachée d'un bruit d'analyse, et ce bruit superposé à la trajectoire empêche de distinguer finement la dynamique du centre de masse. Pour nous en convaincre, considérons une trajectoire synthétique (avec des pas browniens ayant individuellement une dynamique « explosive »), et superposons-lui du bruit. Le résultat de l'analyse de cette trajectoire non bruitée puis bruitée se trouve en figure C.2.

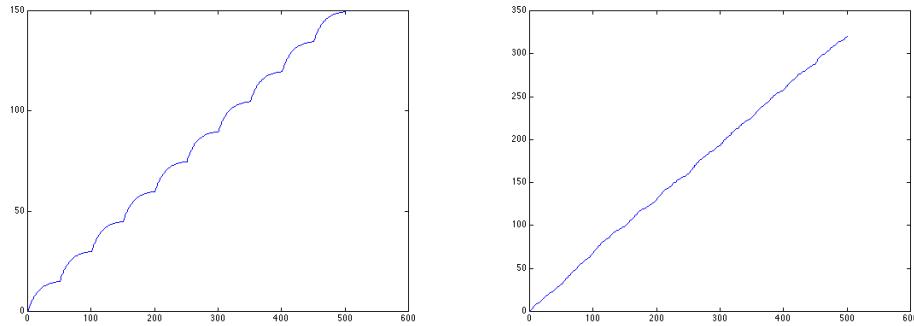


FIG. C.2: Exemple d'évolution de l'abscisse curviligne d'une trajectoire en fonction du temps (non bruitée à gauche, bruitée à droite).

La figure C.2 montre donc que la présence de bruit peut faire disparaître la dynamique protrusive présente à petite échelle. Nous allons donc essayer de filtrer les données pour diminuer l'influence du bruit. La méthode retenue consiste à moyenner la position du centre de masse à un temps t avec ses voisins. Un exemple de résultat obtenu est illustré figure C.3.

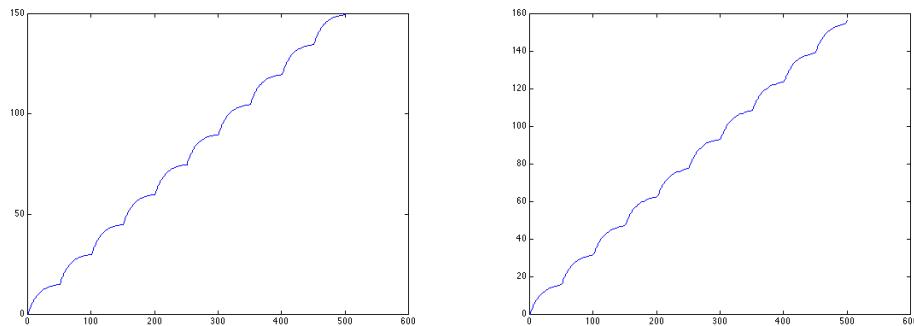


FIG. C.3: Exemple d'évolution de l'abscisse curviligne d'une trajectoire en fonction du temps (non bruitée à gauche, bruitée puis filtrée à droite).

Le résultat obtenu figure C.3 montre donc bien l'efficacité du filtrage sur des données synthétiques, l'aspect général de la dynamique étant restitué ; on notera cependant une légère perte au niveau des « démarrages » explosifs en

raison du moyennages sur les positions voisines, mais cet effet est faible pourvu que l'on limite le nombre de voisins sur lequel on effectue le moyennage.

Reprendons à présent notre trajectoire réelle bruitée (vue figure C.1) et appliquons-lui cette méthode de filtrage ; le résultat se trouve en figure C.4.

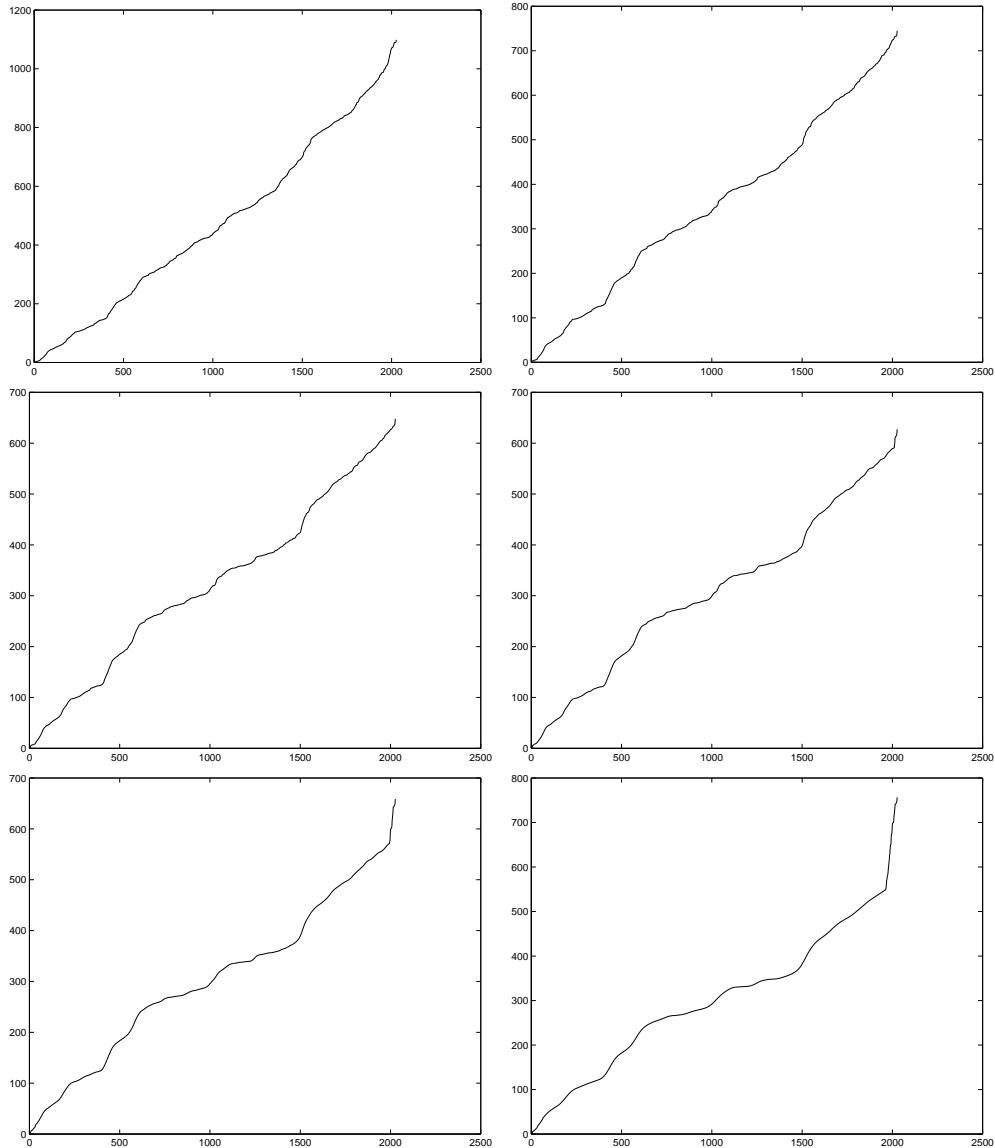


FIG. C.4: Abscisse curviligne, effets de divers lissages du bruit (filtrage de force croissante en allant de bas en haut et de gauche à droite).

Les résultats vus sur la figure C.4 montrent donc que moyenner sur les plus proches voisins permet de diminuer très efficacement le bruit, et l'on retrouve bien comme attendu une dynamique avec alternance de progressions rapides (développement de blebs) et lentes (fin d'expansion de bleb ou pas d'activité). On remarque que lorsque l'on commence à moyenner sur trop de voisins, on ne gagne plus en terme de diminution du bruit mais on commence à « lisser » la

dynamique de la trajectoire elle-même.

Annexe D

Calcul théorique : centre de masse d'une protrusion en forme de portion de disque

Le calcul exposé ici donne l'expression du déplacement du centre de masse d'une protrusion discoïde en fonction du déplacement du bord cellulaire ; cette expression est utilisée en section II.C.1.c pour appuyer l'idée qu'on peut considérer un profil de vitesse du centre de masse analogue à celui, « explosif », du bord cellulaire protrusif. En pratique, avec les notations détaillées figure D.1, cela revient à exprimer OG (avec G centre de masse de la portion de disque restreinte aux $x > 0$) en fonction de h et a , ce qui moyennant l'hypothèse que a reste constant au cours du développement de la protrusion donne une relation directe entre $h(t)$ et $OG(t)$.

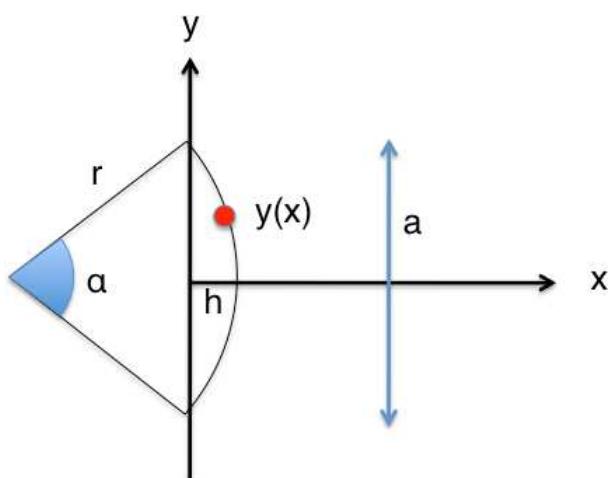


FIG. D.1: Schéma explicatif des notations employées.

Nous avons d'une part, si $y(x)$ représente le bord de la protrusion :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = 2 \int_0^h x.y(x).dx$$

Or comme $r^2 = y^2(x) + (x + (r - h))^2$, on a donc $y(x) = \sqrt{r^2 - (x + r - h)^2}$
d'où :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = 2 \int_0^h x \sqrt{r^2 + (x + r - h)^2} dx$$

Avec le changement de variable $r.u = x + r - h$ (soit $r.du = dx$), on obtient :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = 2 \int_{\frac{r-h}{r}}^1 r^2(ru - r + h) \sqrt{1 - u^2} du$$

Soit :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = 2r^3 \int_{\frac{r-h}{r}}^1 u \sqrt{1 - u^2} du - 2(r - h)r^2 \int_{\frac{r-h}{r}}^1 \sqrt{1 - u^2} du$$

Pour la seconde partie de l'expression, on effectue le changement de variable $u = \sin(t)$ (soit $du = \cos(t).dt$), d'où :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = 2r^3 \left[-\frac{(1 - u^2)^{\frac{3}{2}}}{3} \right]_{\frac{r-h}{r}}^1 - 2(r - h)r^2 \int_{\arcsin(\frac{r-h}{r})}^{\frac{\pi}{2}} \cos^2(t) dt$$

Puis :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = \frac{2}{3}r^3 \left(1 - \left(\frac{r - h}{r} \right)^2 \right)^{\frac{3}{2}} - 2(r - h)r^2 \int_{\arcsin(\frac{r-h}{r})}^{\frac{\pi}{2}} \frac{1 + \cos(2t)}{2} dt$$

D'où :

$$\begin{aligned} \mathcal{A}.OG(h, r) &= \frac{2}{3}(2rh - h^2)^{\frac{3}{2}} - (r - h)r^2 \left(\left(\frac{\pi}{2} - \arcsin \left(1 - \frac{h}{r} \right) \right) \right. \\ &\quad \left. + \left[\frac{\sin(2t)}{2} \right]_{\arcsin(\frac{r-h}{r})}^{\frac{\pi}{2}} \right) \end{aligned}$$

Et ainsi :

$$\mathcal{A}.OG(h, r) = \frac{2}{3}(2rh - h^2)^{\frac{3}{2}} - (r - h)r^2 \left(\frac{\pi}{2} - \arcsin \left(1 - \frac{h}{r} \right) - \frac{1}{2} \sin \left(2 \arcsin \left(1 - \frac{h}{r} \right) \right) \right)$$

Or, on souhaite avoir $\mathcal{A}.OG(h, a)$ plutôt que $\mathcal{A}.OG(h, r)$, ce que l'on obtient car $r^2 = \frac{a^2}{4} + (r - h)^2$, d'où $r = \frac{1}{2h} \left(\frac{a^2}{4} + h^2 \right)$, et ainsi, après substitutions :

$$\mathcal{A}.OG(h, a) = \frac{a^3}{12} - \frac{1}{8h^3} \left(\frac{a^2}{4} - h^2 \right) \left(\frac{a^2}{4} + h^2 \right)^2 \cdot \left(\frac{\pi}{2} - \arcsin \left(1 - \frac{2h^2}{\frac{a^2}{4} + h^2} \right) - \sin \left(2 \arcsin \left(1 - \frac{2h^2}{\frac{a^2}{4} + h^2} \right) \right) \right)$$

D'où :

$$\mathcal{A}.OG(h, a) = \frac{a^3}{12} - \frac{1}{8h^3} \left(\frac{a^2}{4} - h^2 \right) \left(\frac{a^2}{4} + h^2 \right)^2 \cdot \left(\frac{\pi}{2} - \arcsin \left(\frac{\frac{a^2}{4} - h^2}{\frac{a^2}{4} + h^2} \right) - \sin \left(2 \arcsin \left(\frac{\frac{a^2}{4} - h^2}{\frac{a^2}{4} + h^2} \right) \right) \right)$$

Il nous reste alors à calculer $\mathcal{A}(h, a)$. Ceci s'obtient assez facilement en considérant que l'aire en question est celle d'un secteur de disque d'angle α (ie $\pi \cdot r^2 \cdot \frac{\alpha}{2\pi}$) moins celle d'un triangle isocèle de base a et de hauteur $(r - h)$ ($\frac{a(r-h)}{2}$). Ainsi :

$$\mathcal{A}(h, a, r, \alpha) = \pi \cdot r^2 \frac{\alpha}{2\pi} - \frac{a(r-h)}{2}$$

Ne reste plus qu'à se débarrasser de r et α . Pour r , on a simplement $r(h, a) = \frac{1}{2h} \left(\frac{a^2}{4} + h^2 \right)$. Pour α , comme :

$$\sin \alpha = \frac{\left(\frac{a}{2}\right)}{r}$$

On a donc :

$$\frac{\alpha}{2} = \arcsin\left(\frac{a}{2r}\right) = \arcsin\left(\frac{a}{2\frac{a^2}{4} + h^2}\right)$$

On obtient donc finalement :

$$\mathcal{A}(h, a) = \frac{1}{4h^2} \left(\frac{a^2}{4} + h^2 \right)^2 \cdot \arcsin\left(\frac{4ah}{a^2 + 4h^2}\right) + \frac{a}{2} \left(h - \frac{1}{2h} \left(\frac{a^2}{4} + h^2 \right) \right)$$

Un développement au premier ordre en $\frac{h}{a}$ nous donne le comportement pour $\frac{h}{a} \ll 1$: on obtient que $\mathcal{A}(h, a) \sim_{\frac{h}{a} \ll 1} \frac{ah}{2}$. Ceci correspond à un triangle isocèle de base a et de hauteur h .

Le comportement plus général pour $0 < \frac{h}{a} < \frac{1}{2}$ s'obtient en traçant $\mathcal{A}(h, a)$ fonction de $\frac{h}{a}$ (figure D.2). On remarque que l'augmentation est légèrement plus que linéaire.

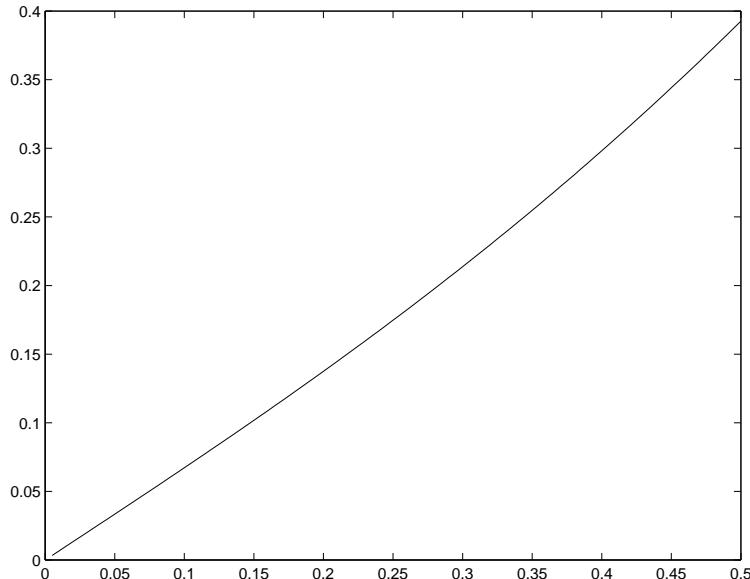


FIG. D.2: $\mathcal{A}(h, a)$ fonction de $\frac{h}{a}$; l'unité d'échelle en ordonnée est a^2 .

De même, on peut tracer l'évolution de OG fonction de $\frac{h}{a}$ (figure D.3). On notera que l'évolution semble encore très légèrement sur-linéaire.

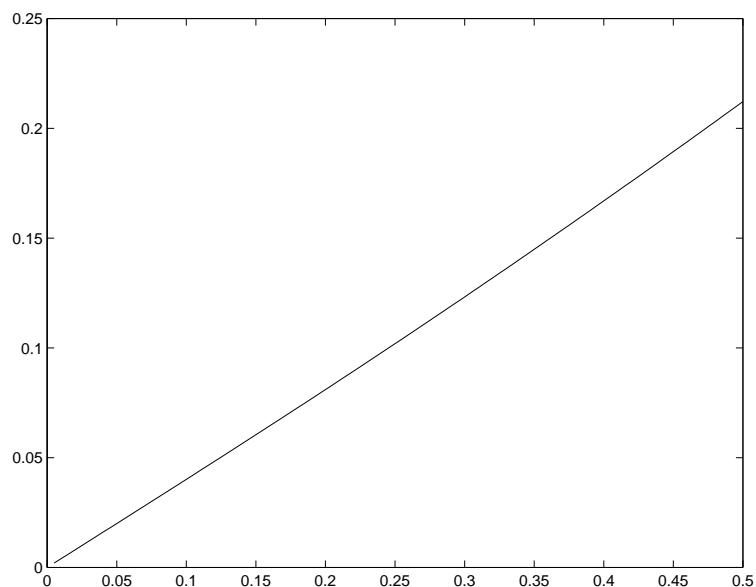


FIG. D.3: OG fonction de $\frac{h}{a}$; l'unité d'échelle en ordonnée est a .

Annexe E

Algorithme de détection automatique de protrusions individuelles

Cette section décrit les résultats obtenus par un des algorithmes que nous avons mis au point : à partir des données brutes de déplacement local, il sélectionne les zones en progression, et les associe de proche en proche pour repérer l'ensemble de la protrusion.

Commençons par appliquer cet algorithme sur des données synthétiques pour tester son efficacité : un premier exemple est détaillé figure E.1 où l'on contrôle qu'à morphologie constante, l'algorithme détecte convenablement le « bord protruſif » à l'avant avec une segmentation correcte en différentes protrusions selon les arrêts et redémarrages de la forme géométrique.

Un second exemple qui teste la robustesse de l'algorithme à la fois aux changements morphologiques et à la présence conjointe de plusieurs protrusions est détaillé figure E.2.

Des exemples d'application de l'algorithme sur des données cellulaires réelles sont décrits figure E.3. Le résultat est intéressant, mais sur des données réelles, la présence de bruit sur la détection des contours nous complique la tâche. Il est alors nécessaire de rajouter différents tests et paramètres pour avoir une exactitude et une robustesse de détection, or le temps nous a manqué pour pousser cela à son terme. Nous nous sommes donc contentés dans notre étude d'une sélection manuelle de quelques trajectoires représentatives (section II.D).

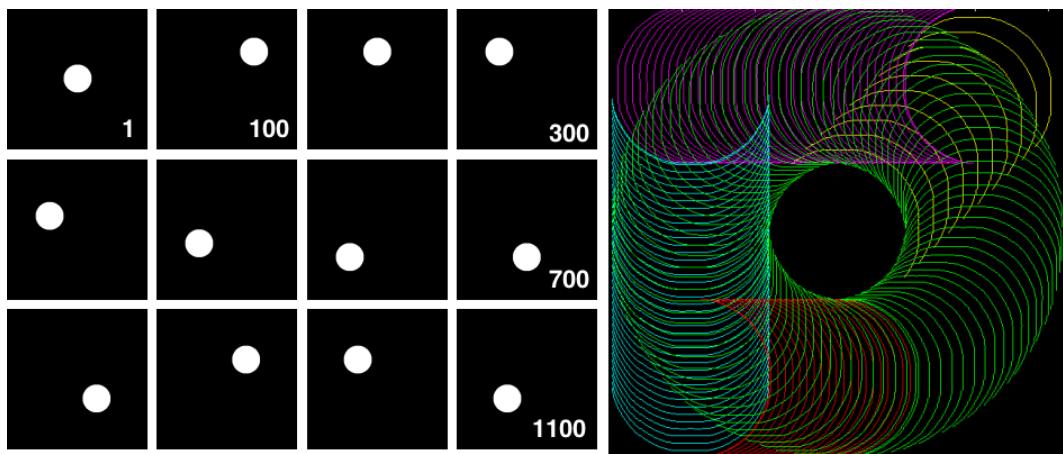


FIG. E.1: Test de l'algorithme de segmentation automatique des protrusions sur un objet synthétique, analogue à la forme des données obtenues à l'étape du traitement B.1.c. Ici la morphologie de l'objet est constante (un disque). Les 12 miniatures de gauche sont extraites du film de déplacement de l'objet : il se déplace d'abord dans le coin supérieur droit, puis vers le coin supérieur gauche, puis le coin inférieur gauche, puis vers le centre-bas, puis il effectue un déplacement complet sur un cercle. L'image de droite représente la détection des protrusions (une couleur différente par protrusion). Les 5 mouvements successifs du disque sont bien détectés comme 5 protrusions distinctes ; la méthode de détection de proche en proche permet bien de détecter le dernier mouvement circulaire comme résultant d'un seul événement.

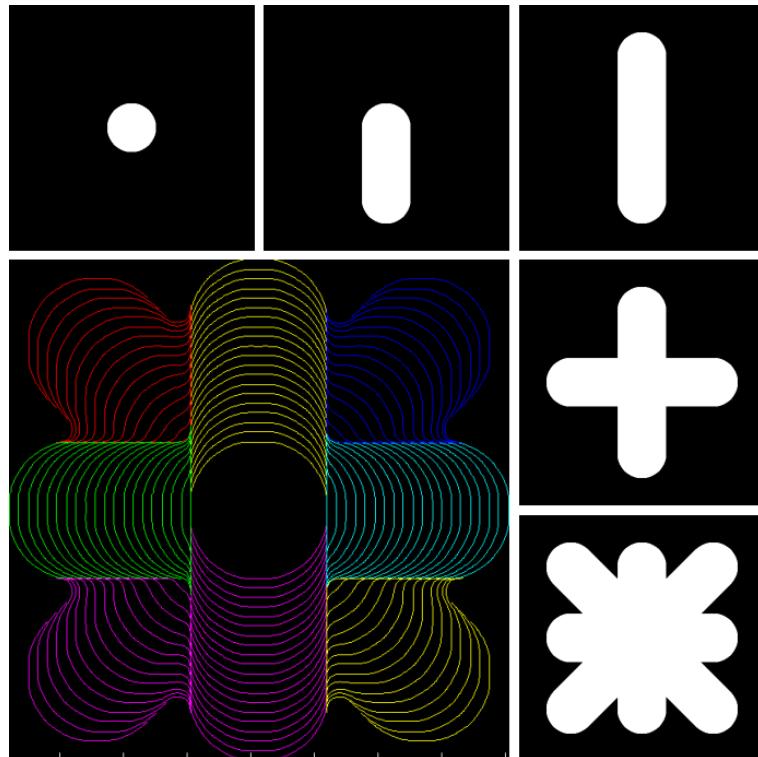


FIG. E.2: Autre test de l'algorithme de segmentation automatique des protrusions sur un objet synthétique, analogue à la forme des données obtenues à l'étape du traitement B.1.c.. Ici la morphologie de l'objet évolue au cours du temps et plusieurs protrusions peuvent être présentes simultanément. Les miniatures successives en haut et à droite représentent l'évolution morphologique de l'objet : initialement c'est un disque, on a d'abord extension d'une protrusion vers le bas, puis une autre vers le haut, puis simultanément une à droite et l'autre à gauche, puis simultanément 4 protrusions le long des diagonales. L'image en bas à gauche représente le résultat de détection des protrusions : les 8 protrusions sont bien détectées indépendamment (le nombre de couleurs limité pour l'affichage de courbes avec Matlab fait que l'on a des doublons de couleurs à l'affichage).

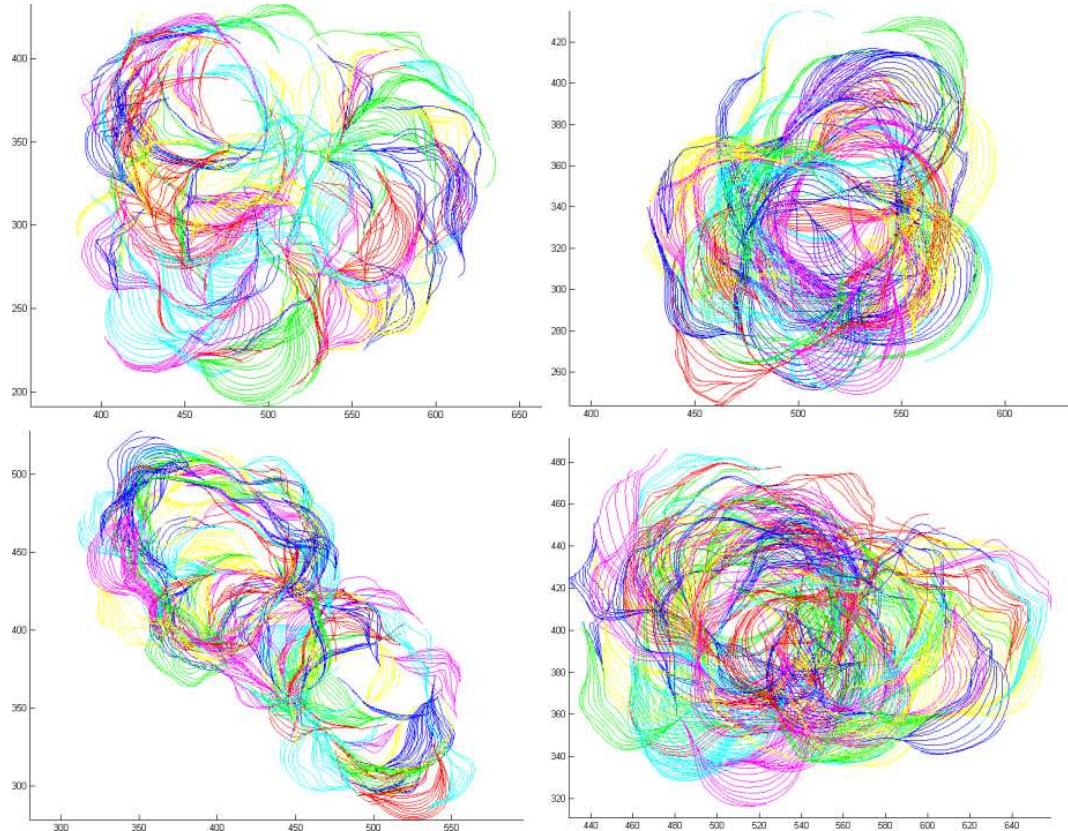


FIG. E.3: Application de l'algorithme de segmentation automatique de protrusions sur des cellules réelles. On trace les portions de contours détectées comme étant des protrusions par l'algorithme en prenant une couleur différente pour chaque protrusions (il y a des doublons dus à la palette de couleurs limitée pour l'affichage de courbes sous Matlab®). Une grande majorité de protrusions détectées en tant que telles montre la forme attendue de portions circulaires successives similaires à ce qui est obtenu figure II.25 b pour une protrusion individuelle.

Annexe F

Synopsis des principales commandes Matlab utilisées

F.1 Gestion des données sous forme de « structures »

La philosophie générale est d'utiliser des « structures » qui permettent de stocker de façon souple et modulable un grand nombre d'informations.

F.1.1 Structure film

Pour un film de N images, la structure correspondante sera de dimension 1xN. Les champs constituant la base de la structure sont détaillés dans le tableau F.1.

Pour des films de petite taille (pas plus de quelques centaines de Mo), il est possible de stocker les images directement dans la structure de film. Mais dès que l'on atteint quelques milliers d'images, il n'est plus possible de stocker sous forme de structure matlab une telle quantité de données (des erreurs apparaissent indiquant que l'on atteint le maximum de mémoire que Matlab peut allouer). Aussi, il est alors nécessaire de mettre dans un répertoire toutes les images du film (en format TIFF par exemple) conjointement avec la structure de film (sous forme « film.mat » classiquement), dans laquelle on consacre un champ au stockage du nom de fichier correspondant.

F.1.2 Structure analyse

Une structure « analyse » est une structure de taille 1xM où M est le nombre de trajectoires analysées. Les champs constituant la base de la structure sont

Nom du champ	Détails
filename	nom du fichier image correspondant (avec chemin complet)
data	données image (champ éventuellement supprimé)
width	largeur image
height	hauteur image
bits	type de codage des données (convention TIFFREAD)
photo_type	convention TIFFREAD
document_name	nom du fichier sans l'extension (convention TIFFREAD)
info	convention TIFFREAD
x_resolution	résolution en abscisse
y_resolution	résolution en ordonnée
resolution_unit	unité d'espace dans laquelle sont exprimées les résolutions verticales et horizontales (typiquement : le micron, 'micron')
frequency	fréquence d'acquisition (unité : $1/time_unit$)
time	incrément temporel
time_unit	unité de l'incrément temporel (typiquement : la seconde, 'second')

TAB. F.1: Champs de base de la structure « film ».

détaillés dans le tableau F.2.

F.2 Commandes « macro » de gestion des films

On considère que chaque film occupe un répertoire séparé. Les fonctions « macro » (tableau F.3) agissent au niveau du répertoire parent (ie : elles traitent avec une profondeur d'un répertoire seulement).

Nom du champ	Détails
filename	nom d'un fichier image correspondant à la trajectoire (avec chemin complet), permet de savoir à quelle manip appartient la trajectoire
x_resolution	Résolution en abscisse
y_resolution	Résolution en ordonnée
resolution_unit	unité d'espace dans laquelle sont exprimées les résolutions verticales et horizontales (typiquement : le micron, 'micron')
frequency	Fréquence d'acquisition (unité : $1/time_unit$)
time_unit	Unité de l'incrément temporel (typiquement : la seconde, 'second')
edges_cellcenter	Trajectoire du centre géométrique de la cellule considérée
edges_cellarea	Aire de la cellule durant la trajectoire considérée
msd_values	Déplacement-carré moyen correspondant à la trajectoire (dans les unités <i>resolution_unit</i> et <i>time_unit</i>)
msd_errors	Barres d'erreur associées au calcul du déplacement-carré moyen

TAB. F.2: Champs de base de la structure « analyse ».

Objet	Nom de la commande
Conversion de films quicktime (.mov) en répertoires contenant des séries d'images au format TIFF	macro_primary
A partir de répertoires contenant des séries d'images au format TIFF, création dans chaque répertoire de la structure « film » correspondante	macro
Ajout dans la structure de film des paramètres de résolutions temporelles et spatiales	macro_params
Segmentation des images	macro_trt
Création de films AVI permettant de contrôler la qualité de la segmentation	macro_overlay
Détection des contours	macro_trt2edge
Analyse	macro_analyse

TAB. F.3: Fonctions macros Matlab.

Annexe G

Statistiques événements

Référence cellule	Nombre total de protrusions	dont nombre de protrusions incluant une phase 1/2	dont nombre de protrusions incluant une phase 1 et/ou 2 seule
6623-1109	83	59	41
6623-1121	54	37	16
6623-1125-1	15	4	3
6623-1125-2	27	19	14
6628-1128-1	11	6	1
6623-1128-2	36	26	10
6623-1128-3	32	24	11
6623-1139-1	107	63	35

TAB. G.1: Statistiques de protrusions (phases 1/2/3...)

Annexe H

Peptide Lifeact

La construction utilisée est MGVADLIKKFESISKEE avec le linker GDPP-VAT, amplifiée par PCR en utilisant les nucléotides ATGGTACCATGG-GAGTTGCTGATCTTATTAAAAAATTCGAATCAATTCAAAGAAGAAG et ATGGTACCAGGTAGCAACTGGTGGATCTCCTTCTTGAAAATTGATTCG. Le fragment PCR clivé avec *Kpn*I-*Bam*HI a été cloné dans un vecteur pNeo-GFP puis transfектé dans les cellules.

Bibliographie

- M. Ahearne, Y. Yang, A. J. El Haj, K. Y. Then, and K. K. Liu. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*, 2(5) :455–63, 2005.
- B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walters. *L'essentiel de la biologie cellulaire, introduction à la biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion, 2002.
- R. D. Allen. A new theory of ameboid movement and protoplasmic streaming. *Exp Cell Res*, Suppl 8 :17–31, 1961.
- P. Arhets, J. C. Olivo, P. Gounon, P. Sansonetti, and N. Guillen. Virulence and functions of myosin ii are inhibited by overexpression of light meromyosin in entamoeba histolytica. *Mol Biol Cell*, 9(6) :1537–47, 1998.
- M. Bailly and J. Condeelis. Cell motility : insights from the backstage. *Nat Cell Biol*, 4(12) :E292–4, 2002.
- M. Balland, N. Desprat, D. Icard, S. Fereol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon, and F. Gallet. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 74(2 Pt 1) :021911, 2006.
- R. N. Band and H. Cirrito. Growth response of axenic entamoeba histolytica to hydrogen, carbon dioxide, and oxygen. *J Protozool*, 26(2) :282–6, 1979.
- A. Bernheim-Groswasser, J. Prost, and C. Sykes. Mechanism of actin-based motility : a dynamic state diagram. *Biophys J*, 89(2) :1411–9, 2005.
- M. Bindschadler and J. L. McGrath. Formin' new ideas about actin filament generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41) :14685–6, 2004.
- H. Blaser, M. Reichman-Fried, I. Castanon, K. Dumstrei, F. L. Marlow, K. Kawakami, L. Solnica-Krezel, C. P. Heisenberg, and E. Raz. Migration of zebrafish primordial germ cells : a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell*, 11(5) :613–27, 2006.
- S. Blazquez, C. Zimmer, G. Guigon, J. C. Olivo-Marin, N. Guillen, and E. Labruyere. Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite entamoeba histolytica. *Infect Immun*, 74(2) :1407–11, 2006.

- G. G. Borisy and T. M. Svitkina. Actin machinery : pushing the envelope. *Curr Opin Cell Biol*, 12(1) :104–12, 2000.
- E. Boroske, M. Elwenspoek, and W. Helfrich. Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles. *Biophys J*, 34(1) :95–109, 1981.
- Dennis Bray. *Cell movement*. Garland publishing, inc., first edition, 1992.
- Dennis Bray. *Cell movement*. Garland publishing, inc., second edition, 2001.
- M. S. Bretscher. Endocytosis : relation to capping and cell locomotion. *Science*, 224(4650) :681–6, 1984.
- M. S. Bretscher. Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell*, 87(4) :601–6, 1996.
- M. S. Bretscher. Exocytosis provides the membrane for protrusion, at least in migrating fibroblasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(11) :916, 2008.
- F. Brochard-Wyart, N. Borghi, D. Cuvelier, and P. Nassoy. Hydrodynamic narrowing of tubes extruded from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20) :7660–3, 2006.
- Jan Brugues. *Studies of dynamical phenomena in soft-matter and biology*. PhD thesis, Universitat de Barcelona, 2008.
- M. R. Bubb, I. Spector, B. B. Beyer, and K. M. Fosen. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. an explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem*, 275(7) :5163–70, 2000.
- M. F. Carlier and D. Pantaloni. Control of actin assembly dynamics in cell motility. *J Biol Chem*, 282(32) :23005–9, 2007.
- S. B. Carter. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature*, 213(73) :256–60, 1967.
- J. R. Cedeno and D. J. Krogstad. Susceptibility testing of entamoeba histolytica. *J Infect Dis*, 148(6) :1090–5, 1983.
- G. Charras and E. Paluch. Blebs lead the way : how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9) :730–6, 2008.
- G. T. Charras, J. C. Yarrow, M. A. Horton, L. Mahadevan, and T. J. Mitchison. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435(7040) :365–9, 2005.
- G. T. Charras, C. K. Hu, M. Coughlin, and T. J. Mitchison. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol*, 175(3) :477–90, 2006.
- G. T. Charras, M. Coughlin, T. J. Mitchison, and L. Mahadevan. Life and times of a cellular bleb. *Biophys J*, 94(5) :1836–53, 2008.

- S. Chaudhuri and S. Raha. Inhibition and stimulation of growth of entamoeba histolytica in culture : association with pkc activity and protein phosphorylation. *Exp Parasitol*, 95(1) :28–35, 2000.
- E. S. Chhabra and H. N. Higgs. The many faces of actin : matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol*, 9(10) :1110–21, 2007.
- J. Condeelis. Are all pseudopods created equal? *Cell Motil Cytoskeleton*, 22(1) :1–6, 1992.
- S. Coscoy, E. Huguet, and F. Amblard. Statistical analysis of sets of random walks : how to resolve their generating mechanism. *Bull Math Biol*, 69(8) :2467–92, 2007.
- E. Coudrier, F. Amblard, C. Zimmer, P. Roux, J. C. Olivo-Marin, M. C. Rigothier, and N. Guillen. Myosin ii and the gal-galnac lectin play a crucial role in tissue invasion by entamoeba histolytica. *Cell Microbiol*, 7(1) :19–27, 2005.
- E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294(5547) :1708–12, 2001.
- C. C. Cunningham. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol*, 129(6) :1589–99, 1995.
- S. de Beco, C. Gueudry, F. Amblard, and S. Coscoy. Endocytosis is required for e-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(17) :7010–5, 2009.
- L. S. Diamond. Axenic cultivation of entamoeba hitolytica. *Science*, 134 :336–7, 1961.
- R. B. Dickinson and D. L. Purich. Clamped-filament elongation model for actin-based motors. *Biophys J*, 82(2) :605–17, 2002.
- F. D. Dos Santos and T. Ondarcuhu. Free-running droplets. *Phys Rev Lett*, 75(16) :2972–2975, 1995.
- A. Dufour, V. Shinin, S. Tajbakhsh, N. Guillen-Aghion, J. C. Olivo-Marin, and C. Zimmer. Segmenting and tracking fluorescent cells in dynamic 3-d microscopy with coupled active surfaces. *IEEE Trans Image Process*, 14(9) :1396–410, 2005.
- L. Fabian, J. Troscianczuk, and A. Forer. Calyculin a, an enhancer of myosin, speeds up anaphase chromosome movement. *Cell Chromosome*, 6 :1, 2007.
- O. T. Fackler and R. Grosse. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol*, 181(6) :879–84, 2008.

- G. Faure-Andre, P. Vargas, M. I. Yuseff, M. Heuze, J. Diaz, D. Lankar, V. Steri, J. Manry, S. Hugues, F. Vascotto, J. Boulanger, G. Raposo, M. R. Bono, M. Rosemblatt, M. Piel, and A. M. Lennon-Dumenil. Regulation of dendritic cell migration by cd74, the mhc class ii-associated invariant chain. *Science*, 322(5908) :1705–10, 2008.
- A. Fedier and H. U. Keller. Suppression of bleb formation, locomotion, and polarity of walker carcinosarcoma cells by hypertonic media correlates with cell volume reduction but not with changes in the f-actin content. *Cell Motil Cytoskeleton*, 37(4) :326–37, 1997.
- J. R. Frederick and Jr. Petri, W. A. Roles for the galactose-/n-acetylgalactosamine-binding lectin of entamoeba in parasite virulence and differentiation. *Glycobiology*, 15(12) :53R–59R, 2005.
- David Freifelder. *Principles of physical chemistry, with applications to the biological sciences*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 2nd edition, 1985.
- P. Friedl and K. Wolf. Tumour-cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5) :362–74, 2003.
- P. Friedl, S. Borgmann, and E. B. Brocker. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix : lessons from the dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol*, 70(4) :491–509, 2001.
- Y. Fukui. Toward a new concept of cell motility : cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *Int Rev Cytol*, 144 :85–127, 1993.
- B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(11) :793–805, 2001.
- F. Gerbal, P. Chaikin, Y. Rabin, and J. Prost. An elastic analysis of listeria monocytogenes propulsion. *Biophys J*, 79(5) :2259–75, 2000.
- E. D. Goley and M. D. Welch. The arp2/3 complex : an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(10) :713–26, 2006.
- A. Grebecki. Effects of localized photic stimulation on amoeboid movement and their theoretical implications. *Eur J Cell Biol*, 24(2) :163–75, 1981.
- A. Grebecki. Membrane and cytoskeletal flow in motile cells with emphasis on the contribution of free-living amoeba. *Int. Rev. Cytol.*, 148 :37–79, 1994.
- H. P. Grimm, A. B. Verkhovsky, A. Mogilner, and J. J. Meister. Analysis of actin dynamics at the leading edge of crawling cells : implications for the shape of keratocyte lamellipodia. *Eur Biophys J*, 32(6) :563–77, 2003.
- N. Guillen-Aghion. Cytoskeleton components [of entamoeba histolytica]. *personal communication*, 2006.

- M. C. Gutjahr, J. Rossy, and V. Niggli. Role of rho, rac, and rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of walker 256 carcinosarcoma cells. *Exp Cell Res*, 308(2) :422–38, 2005.
- M. Herant, W. A. Marganski, and M. Dembo. The mechanics of neutrophils : synthetic modeling of three experiments. *Biophys J*, 84(5) :3389–413, 2003.
- S. Hugues, L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena. Distinct t cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*, 5(12) :1235–42, 2004.
- D. Humphrey, C. Duggan, D. Saha, D. Smith, and J. Kas. Active fluidization of polymer networks through molecular motors. *Nature*, 416(6879) :413–6, 2002.
- H. Ishihara, B. L. Martin, D. L. Brautigan, H. Karaki, H. Ozaki, Y. Kato, N. Fusetani, S. Watabe, K. Hashimoto, D. Uemura, and et al. Calyculin a and okadaic acid : inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 159(3) :871–7, 1989.
- P. A. Janmey and U. Lindberg. Cytoskeletal regulation : rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8) :658–66, 2004.
- L. W. Janson and D. L. Taylor. In vitro models of tail contraction and cytoplasmic streaming in amoeboid cells. *J Cell Biol*, 123(2) :345–56, 1993.
- L. W. Janson, J. Kolega, and D. L. Taylor. Modulation of contraction by gelation/solation in a reconstituted motile model. *J Cell Biol*, 114(5) :1005–15, 1991.
- J. F. Joanny, F. Julicher, and J. Prost. Motion of an adhesive gel in a swelling gradient : a mechanism for cell locomotion. *Phys Rev Lett*, 90(16) :168102, 2003.
- H. U. Keller and H. Cottier. Crawling-like movements and polarisation in non-adherent leucocytes. *Cell Biol Int Rep*, 5(1) :3–7, 1981.
- H. Keller and P. Eggli. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil Cytoskeleton*, 41(2) :181–93, 1998.
- H. Keller, P. Rentsch, and J. Hagmann. Differences in cortical actin structure and dynamics document that different types of blebs are formed by distinct mechanisms. *Exp Cell Res*, 277(2) :161–72, 2002.
- K. Keren, Z. Pincus, G. M. Allen, E. L. Barnhart, G. Marriott, A. Mogilner, and J. A. Theriot. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*, 453(7194) :475–80, 2008.

- K. Kitamura, B. Judkewitz, M. Kano, W. Denk, and M. Hausser. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat Methods*, 5(1) :61–7, 2008.
- D. R. Kovar. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1) :11–7, 2006.
- K. Kruse, J. F. Joanny, F. Julicher, and J. Prost. Contractility and retrograde flow in lamellipodium motion. *Phys Biol*, 3(2) :130–7, 2006.
- R. Kubo, M. Toda, and N. Hatshitsume. *Statistical Physics II*. 2nd edition edition, 1991.
- D. F. Kucik, E. L. Elson, and M. P. Sheetz. Cell migration does not produce membrane flow. *J Cell Biol*, 111(4) :1617–22, 1990.
- M. Lammers, S. Meyer, D. Kuhlmann, and A. Wittinghofer. Specificity of interactions between mDia isoforms and rho proteins. *J Biol Chem*, 283(50) :35236–46, 2008.
- P. D. Langridge and R. R. Kay. Blebbing of dictyostelium cells in response to chemoattractant. *Exp Cell Res*, 312(11) :2009–17, 2006.
- L. Le Goff, F. Amblard, and E. M. Furst. Motor-driven dynamics in actin-myosin networks. *Phys Rev Lett*, 88(1) :018101, 2002.
- L. Le Goff. *Dynamique et statique des polymeres semi-flexibles : filaments d'actine et reseaux actives par la myosine*. Thesis, Universite Paris 7 - Paris Diderot, 2002.
- J. Lee, A. Ishihara, J. A. Theriot, and K. Jacobson. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature*, 362(6416) :167–71, 1993.
- M. A. Lemmon. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2) :99–111, 2008.
- Y. Leverrier and A. J. Ridley. Apoptosis : caspases orchestrate the rock 'n' bleb. *Nat Cell Biol*, 3(4) :E91–3, 2001.
- C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1) :144–52, 2000.
- B. Loftus, I. Anderson, R. Davies, U. C. Alsmark, J. Samuelson, P. Amedeo, P. Roncaglia, M. Berriman, R. P. Hirt, B. J. Mann, T. Nozaki, B. Suh, M. Pop, M. Duchene, J. Ackers, E. Tannich, M. Leippe, M. Hofer, I. Bruehhaus, U. Willhoeft, A. Bhattacharya, T. Chillingworth, C. Churcher, Z. Hance, B. Harris, D. Harris, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, R. Squares, S. Whitehead, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, H. Norbertczak, C. Price, Z. Wang, N. Guillen, C. Gilchrist, S. E. Stroup, S. Bhattacharya, A. Lohia, P. G. Foster, T. Sicheritz-Ponten, C. Weber, U. Singh, C. Mukherjee, N. M. El-Sayed, Jr. Petri, W. A., C. G. Clark, T. M. Embley, B. Barrell,

- C. M. Fraser, and N. Hall. The genome of the protist parasite *entamoeba histolytica*. *Nature*, 433(7028) :865–8, 2005.
- T. P. Loisel, R. Boujema, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. Reconstitution of actin-based motility of listeria and shigella using pure proteins. *Nature*, 401(6753) :613–6, 1999.
- A. D. Lucio, R. A. Santos, and O. N. Mesquita. Measurements and modeling of water transport and osmoregulation in a single kidney cell using optical tweezers and videomicroscopy. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 68(4 Pt 1) :041906, 2003.
- D. J. Mackay, F. Esch, H. Furthmayr, and A. Hall. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts : an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol*, 138(4) :927–38, 1997.
- I. V. Maly and G. G. Borisy. Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20) :11324–9, 2001.
- S. O. Mast. Structure, movement, locomotion, and stimulation in amoeba. *J Morphol*, 41 :347–425, 1926.
- D. Mazia, G. Schatten, and W. Sale. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, 66(1) :198–200, 1975.
- K. L. McDonald and M. Auer. High-pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques*, 41(2) :137, 139, 141 passim, 2006.
- R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397(6714) :50–3, 1999.
- R. Merkel, R. Simson, D. A. Simson, M. Hohenadl, A. Boulbitch, E. Wallraff, and E. Sackmann. A micromechanic study of cell polarity and plasma membrane cell body coupling in dictyostelium. *Biophys J*, 79(2) :707–19, 2000.
- J. C. Mills, N. L. Stone, J. Erhardt, and R. N. Pittman. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*, 140(3) :627–36, 1998.
- J. C. Mills, N. L. Stone, and R. N. Pittman. Extranuclear apoptosis. the role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol*, 146(4) :703–8, 1999.
- T. J. Mitchison, G. T. Charras, and L. Mahadevan. Implications of a poroelastic cytoplasm for the dynamics of animal cell shape. *Semin Cell Dev Biol*, 19(3) :215–23, 2008.

- D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. Mackintosh. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science*, 315(5810) :370–3, 2007.
- A. Mogilner and L. Edelstein-Keshet. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells : a quantitative analysis. *Biophys J*, 83(3) :1237–58, 2002.
- A. Mogilner and G. Oster. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J*, 71(6) :3030–45, 1996.
- A. Mogilner and G. Oster. Force generation by actin polymerization ii : the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J*, 84(3) :1591–605, 2003.
- A. Mogilner. On the edge : modeling protrusion. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1) :32–9, 2006.
- A. Mogilner. Mathematics of cell motility : have we got its number ? *J Math Biol*, 58(1-2) :105–34, 2009.
- R. D. Mullins, J. A. Heuser, and T. D. Pollard. The interaction of arp2/3 complex with actin : nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11) :6181–6, 1998.
- V. Niggli and J. Rossy. Ezrin/radixin/moesin : Versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.
- V. Niggli. Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21 :57–79, 2005.
- G. Oster. Biophysics of the leading lamella. *Cell Motil Cytoskeleton*, 10(1-2) :164–71, 1988.
- K. Pagh and G. Gerisch. Monoclonal antibodies binding to the tail of dictyostelium discoideum myosin : their effects on antiparallel and parallel assembly and actin-activated atpase activity. *J Cell Biol*, 103(4) :1527–38, 1986.
- E. Paluch, M. Piel, J. Prost, M. Bornens, and C. Sykes. Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys J*, 89(1) :724–33, 2005.
- D. Pantaloni, C. Le Clainche, and M. F. Carlier. Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292(5521) :1502–6, 2001.
- C. S. Peskin, G. M. Odell, and G. F. Oster. Cellular motions and thermal fluctuations : the brownian ratchet. *Biophys J*, 65(1) :316–24, 1993.
- T. D. Pollard and G. G. Borisy. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4) :453–65, 2003.
- T. D. Pollard, L. Blanchoin, and R. D. Mullins. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29 :545–76, 2000.

- T. D. Pollard. Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2) :2747–54, 1986.
- M. Prass, K. Jacobson, A. Mogilner, and M. Radmacher. Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *J Cell Biol*, 174(6) :767–72, 2006.
- D. Raucher, T. Stauffer, W. Chen, K. Shen, S. Guo, J. D. York, M. P. Sheetz, and T. Meyer. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*, 100(2) :221–8, 2000.
- L. Renault, B. Bugyi, and M. F. Carlier. Spire and cordon-bleu : multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol*, 18(10) :494–504, 2008.
- P. S. Rentsch and H. Keller. Suction pressure can induce uncoupling of the plasma membrane from cortical actin. *Eur J Cell Biol*, 79(12) :975–81, 2000.
- J. Riedl, A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. Lifeact : a versatile marker to visualize f-actin. *Nat Methods*, 5(7) :605–7, 2008.
- S. Romero, C. Le Clainche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated atp hydrolysis. *Cell*, 119(3) :419–29, 2004.
- J. Rossy, M. C. Gutjahr, N. Blaser, D. Schlicht, and V. Niggli. Ezrin/moesin in motile walker 256 carcinosarcoma cells : signal-dependent relocalization and role in migration. *Exp Cell Res*, 313(6) :1106–20, 2007.
- K. Schutz and H. Keller. Protrusion, contraction and segregation of membrane components associated with passive deformation and shape recovery of walker carcinosarcoma cells. *Eur J Cell Biol*, 77(2) :100–10, 1998.
- M. Sebbagh, C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio, and J. Breard. Caspase-3-mediated cleavage of rock i induces mlc phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3(4) :346–52, 2001.
- M. Sebbagh, J. Hamelin, J. Bertoglio, E. Solary, and J. Breard. Direct cleavage of rock ii by granzyme b induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med*, 201(3) :465–71, 2005.
- J. R. Sellers. Myosins : a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 1496(1) :3–22, 2000.
- M. P. Sheetz, J. E. Sable, and H. G. Dobereiner. Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35 :417–34, 2006.

- M. P. Sheetz. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(5) :392–6, 2001.
- T. Shemesh, T. Otomo, M. K. Rosen, A. D. Bershadsky, and M. M. Kozlov. A novel mechanism of actin filament processive capping by formin : solution of the rotation paradox. *J Cell Biol*, 170(6) :889–93, 2005.
- J. Solon, P. Streicher, R. Richter, F. Brochard-Wyart, and P. Bassereau. Vesicles surfing on a lipid bilayer : self-induced haptotactic motion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(33) :12382–7, 2006.
- J. A. Spudich. The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(5) :387–92, 2001.
- S. L. Stanley. Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol*, 17(6) :280–5, 2001.
- Jr. Stanley, S. L. Amoebiasis. *Lancet*, 361(9362) :1025–34, 2003.
- A. F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N. J. Westwood, J. R. Sellers, and T. J. Mitchison. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin ii inhibitor. *Science*, 299(5613) :1743–7, 2003.
- T. Takenawa and S. Suetsugu. The wasp-wave protein network : connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1) :37–48, 2007.
- M. E. Taylor and K. Drickamer. Paradigms for glycan-binding receptors in cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 19(5) :572–7, 2007.
- D. L. Taylor, J. S. Condeelis, P. L. Moore, and R. D. Allen. The contractile basis of amoeboid movement. i. the chemical control of motility in isolated cytoplasm. *J Cell Biol*, 59(2 Pt 1) :378–94, 1973.
- C. R. Terenna, T. Makushok, G. Velve-Casquillas, D. Baigl, Y. Chen, M. Bornens, A. Paoletti, M. Piel, and P. T. Tran. Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr Biol*, 18(22) :1748–53, 2008.
- J. A. Theriot, T. J. Mitchison, L. G. Tilney, and D. A. Portnoy. The rate of actin-based motility of intracellular listeria monocytogenes equals the rate of actin polymerization. *Nature*, 357(6375) :257–60, 1992.
- M. Thery, A. Pepin, E. Dressaire, Y. Chen, and M. Bornens. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, 63(6) :341–55, 2006.
- L. G. Tilney and S. Inoue. Acrosomal reaction of the thyone sperm. iii. the relationship between actin assembly and water influx during the extension of the acrosomal process. *J Cell Biol*, 100(4) :1273–83, 1985.
- L. G. Tilney and D. A. Portnoy. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, listeria monocytogenes. *J Cell Biol*, 109(4 Pt 1) :1597–608, 1989.

- C. Tordeux, J. B. Fournier, and P. Galatola. Analytical characterization of adhering vesicles. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 65(4 Pt 1) :041912, 2002.
- D. Traynor and R. R. Kay. Possible roles of the endocytic cycle in cell motility. *J Cell Sci*, 120(Pt 14) :2318–27, 2007.
- P. Vallotton, G. Danuser, S. Bohnet, J. J. Meister, and A. B. Verkhovsky. Tracking retrograde flow in keratocytes : news from the front. *Mol Biol Cell*, 16(3) :1223–31, 2005.
- A. B. Verkhovsky, O. Y. Chaga, S. Schaub, T. M. Svitkina, J. J. Meister, and G. G. Borisy. Orientational order of the lamellipodial actin network as demonstrated in living motile cells. *Mol Biol Cell*, 14(11) :4667–75, 2003.
- A. S. Verkman. Water permeability measurement in living cells and complex tissues. *J Membr Biol*, 173(2) :73–87, 2000.
- A. S. Verkman. More than just water channels : unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, 118(Pt 15) :3225–32, 2005.
- N. von Tscharner Biino, H. Porzig, and H. Keller. Suppression of polarity, locomotion and f-actin levels of walker carcinosarcoma cells by the inhibitor ci-959. *Life Sci*, 61(2) :137–45, 1997.
- D. H. Wachsstock, W. H. Schwarz, and T. D. Pollard. Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophys J*, 66(3 Pt 1) :801–9, 1994.
- D. B. Weibel, W. R. Diluzio, and G. M. Whitesides. Microfabrication meets microbiology. *Nat Rev Microbiol*, 5(3) :209–18, 2007.
- F. Wottawah, S. Schinkinger, B. Lincoln, R. Ananthakrishnan, M. Romeyke, J. Guck, and J. Kas. Optical rheology of biological cells. *Phys Rev Lett*, 94(9) :098103, 2005.
- K. Yoshida and T. Soldati. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci*, 119(Pt 18) :3833–44, 2006.
- S. Yumura and Y. Fukui. Spatiotemporal dynamics of actin concentration during cytokinesis and locomotion in dictyostelium. *J Cell Sci*, 111 (Pt 15) :2097–108, 1998.
- S. Yumura, R. Matsuzaki, and T. Kitanishi-Yumura. Introduction of macromolecules into living dictyostelium cells by electroporation. *Cell Struct Funct*, 20(3) :185–90, 1995.
- S. Yumura. Spatial distribution of fluorescently labeled actin in living dictyostelium amoebae. *Cell Struct Funct*, 21(3) :189–97, 1996.

M. Zaki, N. Andrew, and R. H. Insall. Entamoeba histolytica cell movement : a central role for self-generated chemokines and chemorepellents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(49) :18751–6, 2006.

M. Zelenina and H. Brismar. Osmotic water permeability measurements using confocal laser scanning microscopy. *Eur Biophys J*, 29(3) :165–71, 2000.

Résumé

La polymérisation d'actine fournit la force qui produit directement la motilité dans un grand nombre de cas, mais certaines observations suggèrent que la motilité amiboïde fasse appel à d'autres mécanismes. En utilisant le modèle d'*Entamoeba histolytica*, il avait été précédemment observé que ces cellules produisent des protrusions transitoires, nécessaires au mouvement. Des mutations affectant l'activité de la myosine et des molécules d'adhésion inhibent l'activité protrusive et la motilité [Coudrier *et al.*, 2005]

En nous appuyant sur ces observations, nous avons fait l'hypothèse que les mouvements amiboïdes d'*Entamoeba histolytica* sont contrôlés par une instabilité dynamique cyclique du cortex cellulaire : la membrane plasmique produit un bleb par détachement du cytosquelette cortical, sous l'action d'une pression interne due à la contraction acto-myosine, puis le cortex se reforme sous la surface du bleb. L'expansion initiale rapide (plus rapide que les vitesses maximales de polymérisation d'actine) et l'analogie avec des blebs apoptotiques produits par rupture protéolytique des liens cytosquelette-membrane, étaient des indications fortes que *Entamoeba histolytica* se déplace en émettant des blebs initialement dépourvus de cortex, ce que nous avons pu confirmer par microscopie de fluorescence sur des amibes dont l'actine-F était marquée. Expérimentalement, la formation des protrusions a été analysée en détails par vidéo-microscopie. Les protrusions se développent tout d'abord durant quelques centaines de millisecondes à de très hautes vitesses (jusqu'à quelques dizaines de $\mu\text{m/sec}$). Ensuite, leur expansion se poursuit avec une membrane ayant une forme localement sphérique et en l'absence d'organites intracellulaires dans la protrusion. A un stade ultérieur, le cortex d'actine basal disparaît et l'expansion qui s'ensuit s'accompagne d'un large flot d'organites intracellulaires. Les protrusions peuvent soit être rétractées, soit stabilisées. Le cycle de blebbing / stabilisation conduit à des mouvements cellulaires sans direction persistante, qui se poursuivent des heures durant. Nous présentons ici un modèle physique décrivant les paramètres de contrôle de cette instabilité dynamique. En utilisant la pression d'aspiration d'une micropipette, nous pouvons produire des protrusions, et la géométrie contrôlée de l'expérience donne lieu à des événements protruifs reproductibles, qui peuvent être décrits en détail par une modélisation quantitative appropriée.

De telles instabilités corticales pourraient donc représenter une façon distincte de générer de la motilité cellulaire, pertinente entre autres dans un contexte d'invasion pathogène ou dans le cadre des mouvements de cellules immunitaires.