

# MACHINES CELLULAIRES II

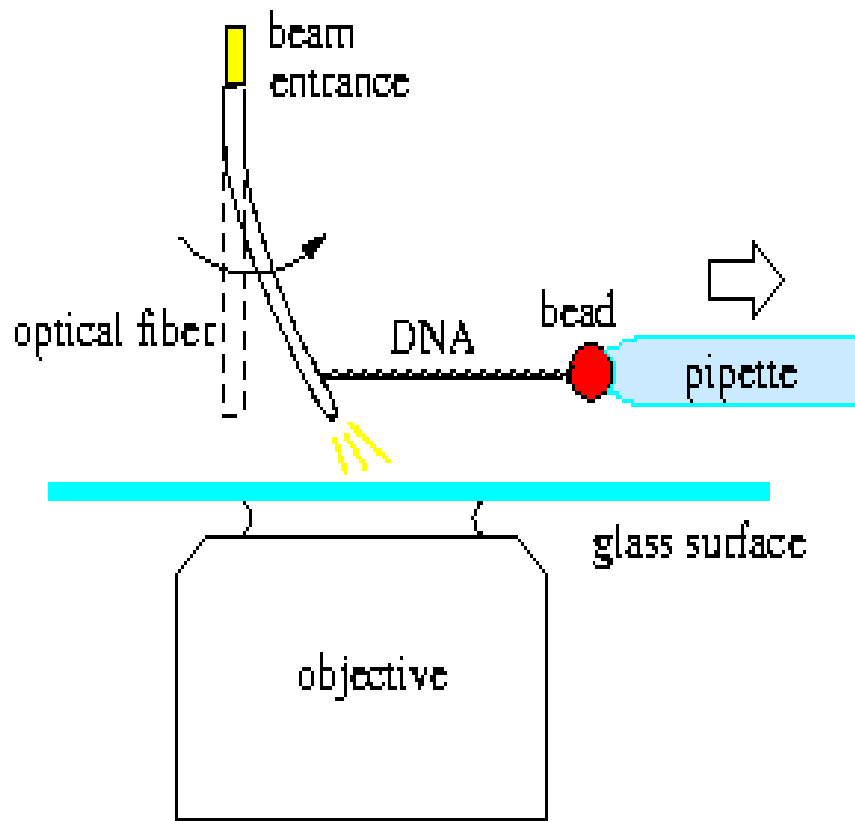
1. **Mesure et production de forces microscopiques**
2. **Traffic Intracellulaire**
3. **Transport – Mobilité**
4. **Mouvement à faible nombre de Reynolds**

# 1. Mesure et production de forces microscopiques

Quelques ordres de grandeurs

<b>Type de force</b>	<b>Exemple</b>	<b>Force de rupture</b>
liaison covalente	C-C	1600 pN
liaison noncovalente	Biotine/streptavidine	160 pN
liaison faible	liaison hydrogène	4 pN
étirement ADN	db étiré à 50%	0.1 pN
Moteur moléculaire	kinésine	5 pN

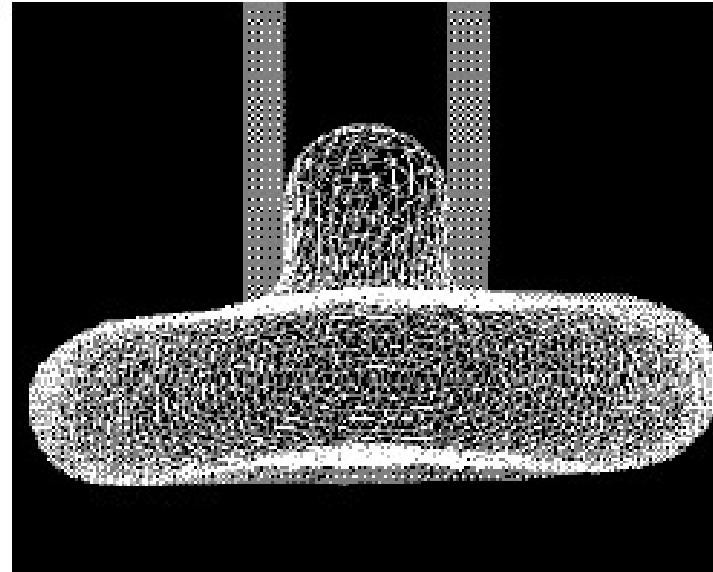
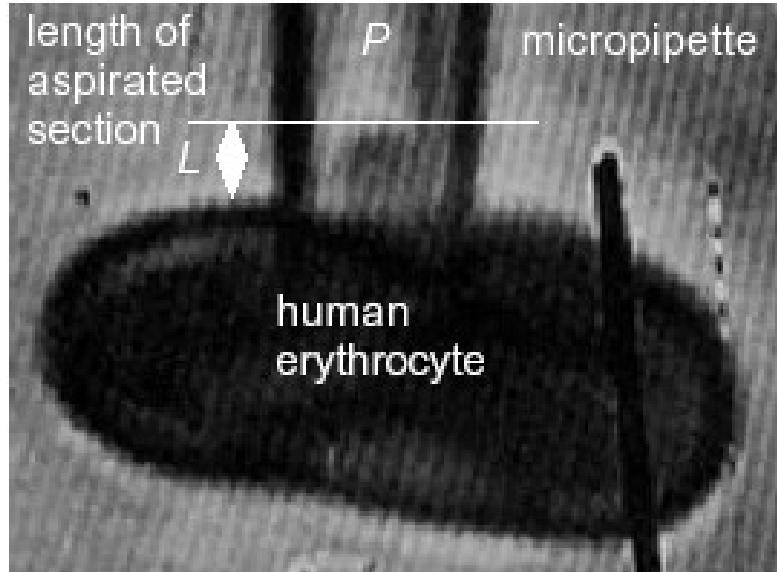
# Fibres semiflexibles



Déplacements en  
nanomètres

Forces en fraction de  
nanoNewtons

# Biomembranes et micropipettes



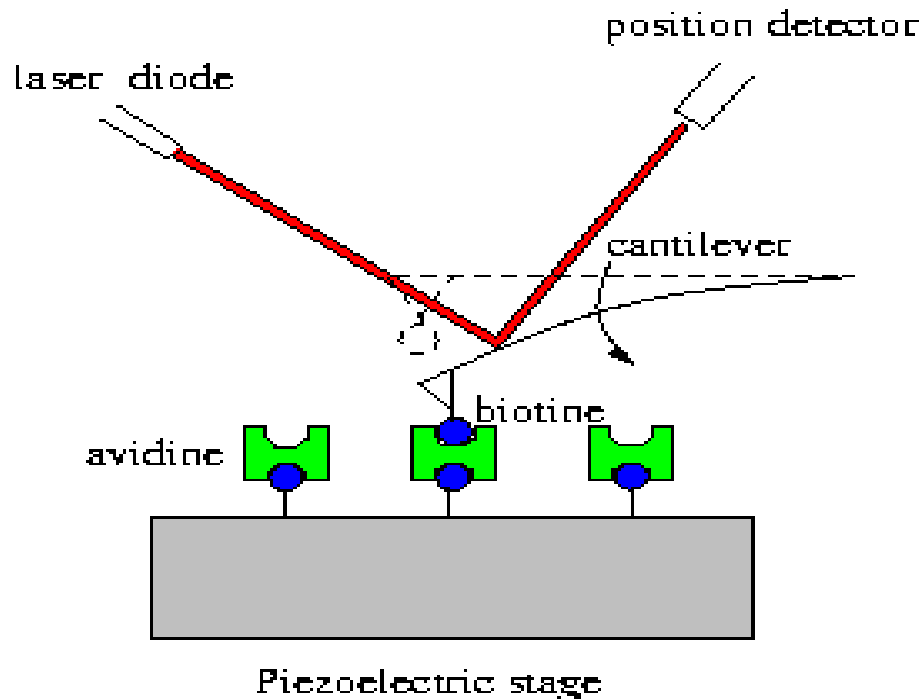
$$P = (\mu / R_p) [ (2L / R_p) - 1 ] + \ln(2L / R_p)]$$

**L = déplacement ; P = sous-pression ;  $\mu$  = tension de surface**  
 **$R_p$  = rayon de la pipette  $\sim 1/2$  micron**

**$\mu \sim 6 \text{ à } 9 \cdot 10^{-6} \text{ J/m}^2$  pour erythrocytes humains**

**$\mu \sim 10^{-4} \text{ J/m}^2$  pour cellules à noyau**

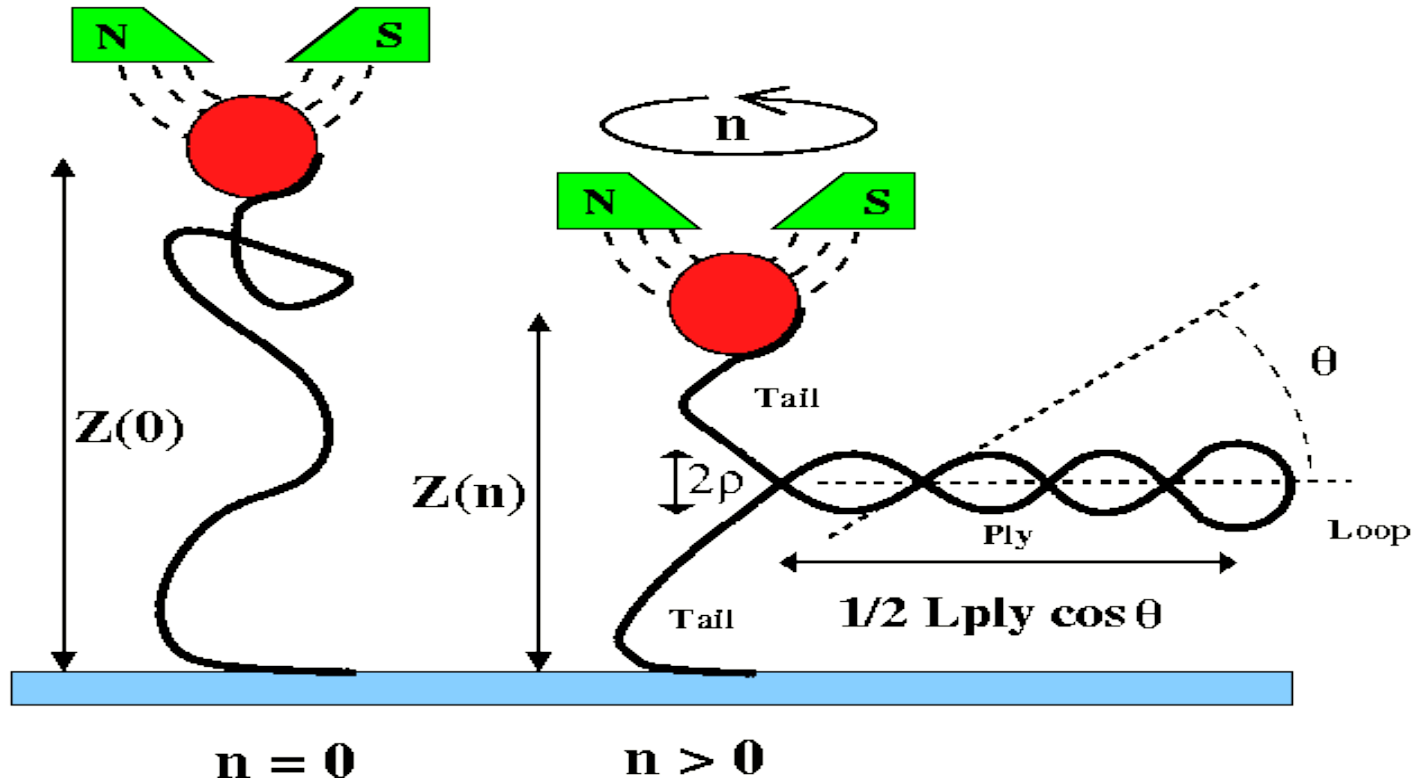
# Microscope à force atomique



Nano version d'une  
aiguille de tourne disque

On peut mesurer des  
forces au dessus de 10  
pN

# Pinces magnétiques



**Principal avantage: manipulation de la position et de la rotation de la particule magnétique (dipôle)**

# Pinces optiques

**Systeme extrêmement performant**

**Le faisceau laser permet de piéger des billes transparentes autour d'un point focal (puits de potentiel harmonique)**

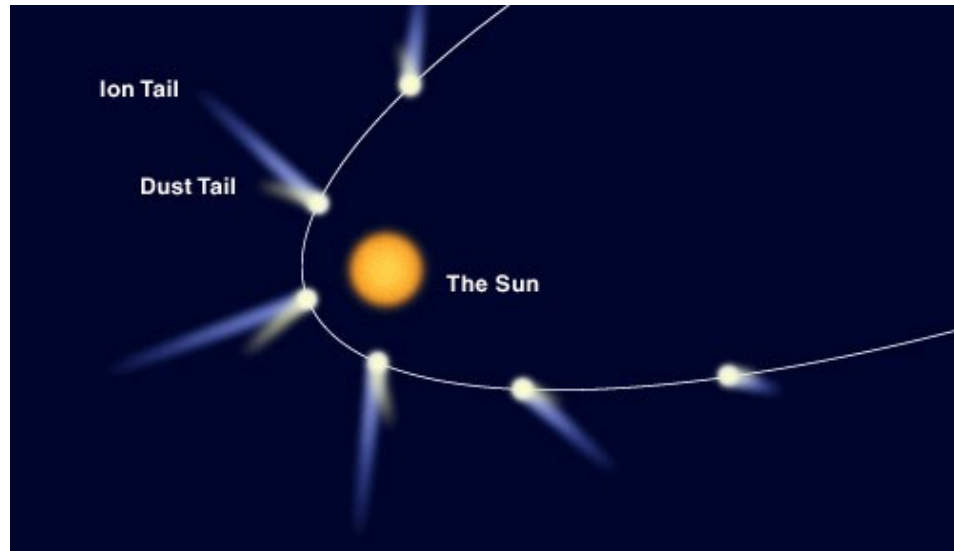
**Mesures de forces de 0,1 pN, si faibles que l'agitation brownienne est importante**

# Force de poussée des photons

Lumière = énergie ET quantité de mouvement

Réfraction de la lumière = changement de quantité de mouvement

 associée à une force

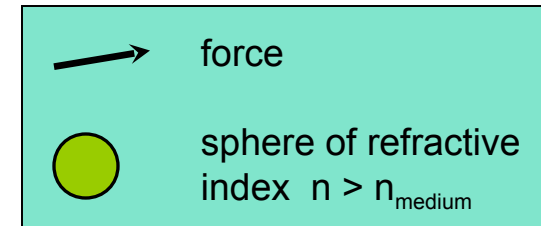
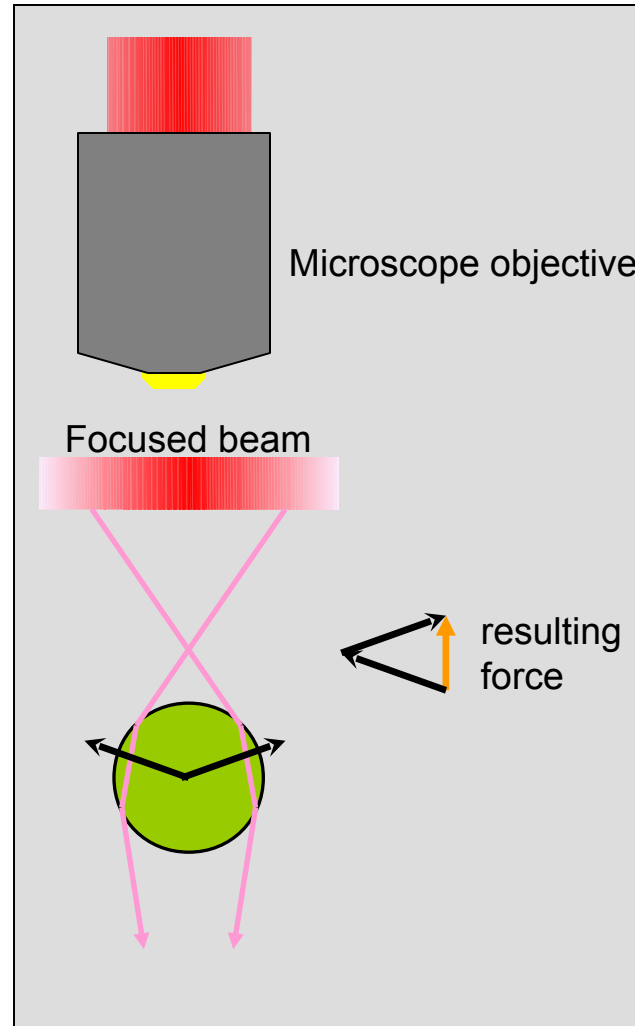
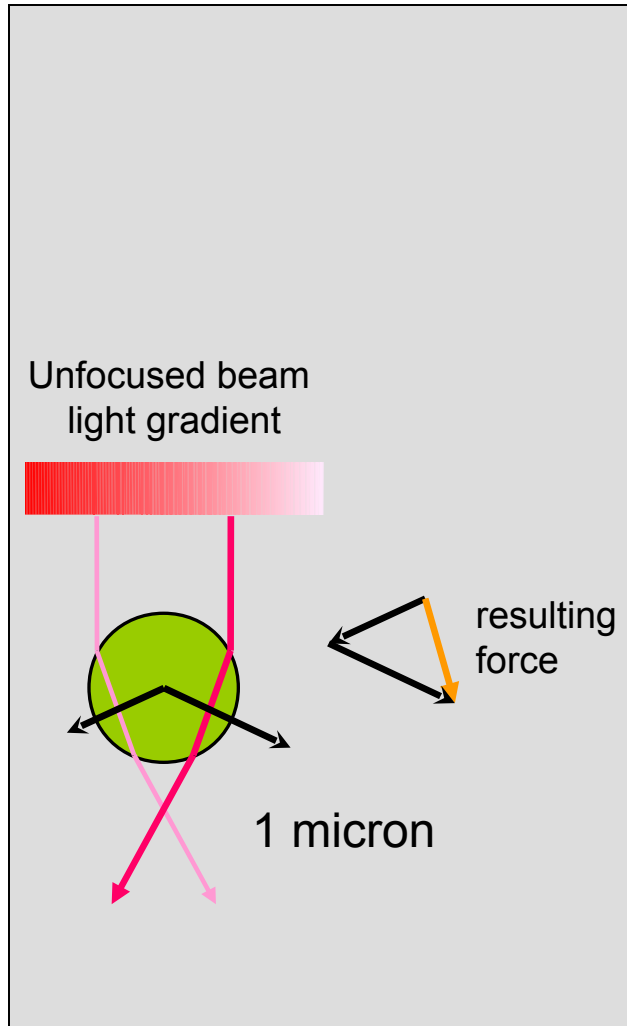


La queue de la comète est opposée au soleil



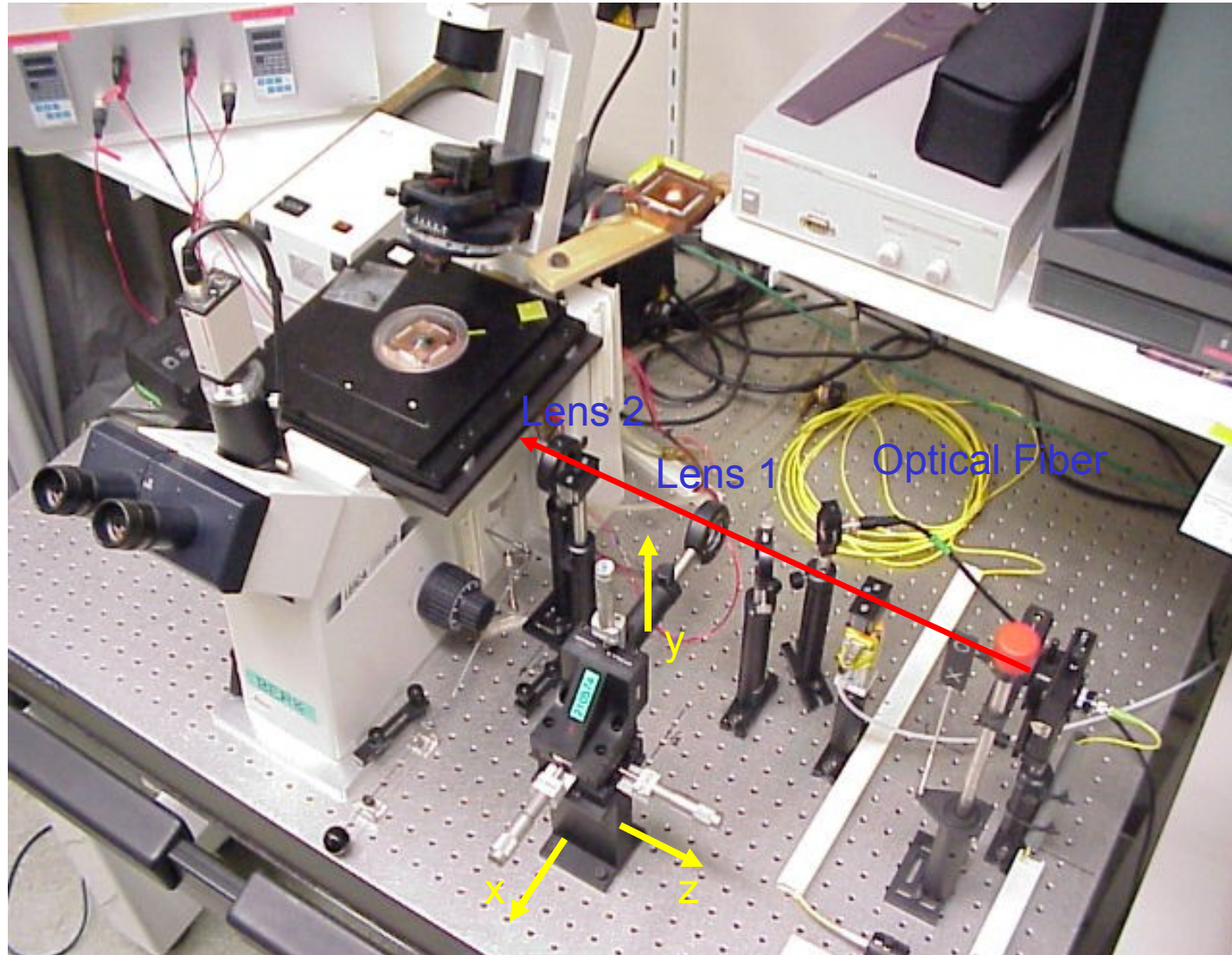
Pression de radiation (un petit tour au tableau)

# Effet sur une bille transparente



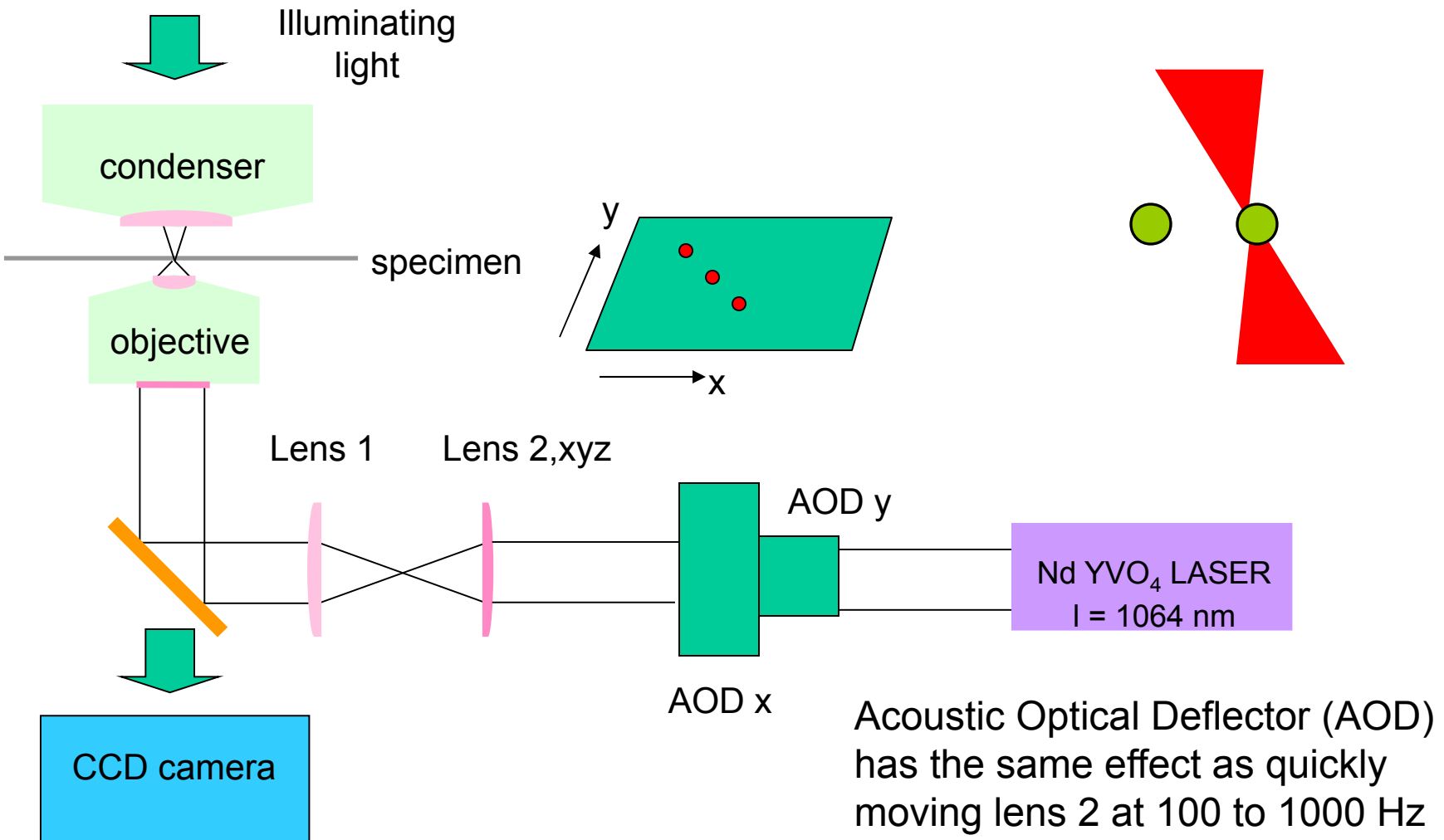
Une petite bille peut être “saisie” et manipulée sous le microscope

# Ensemble expérimental



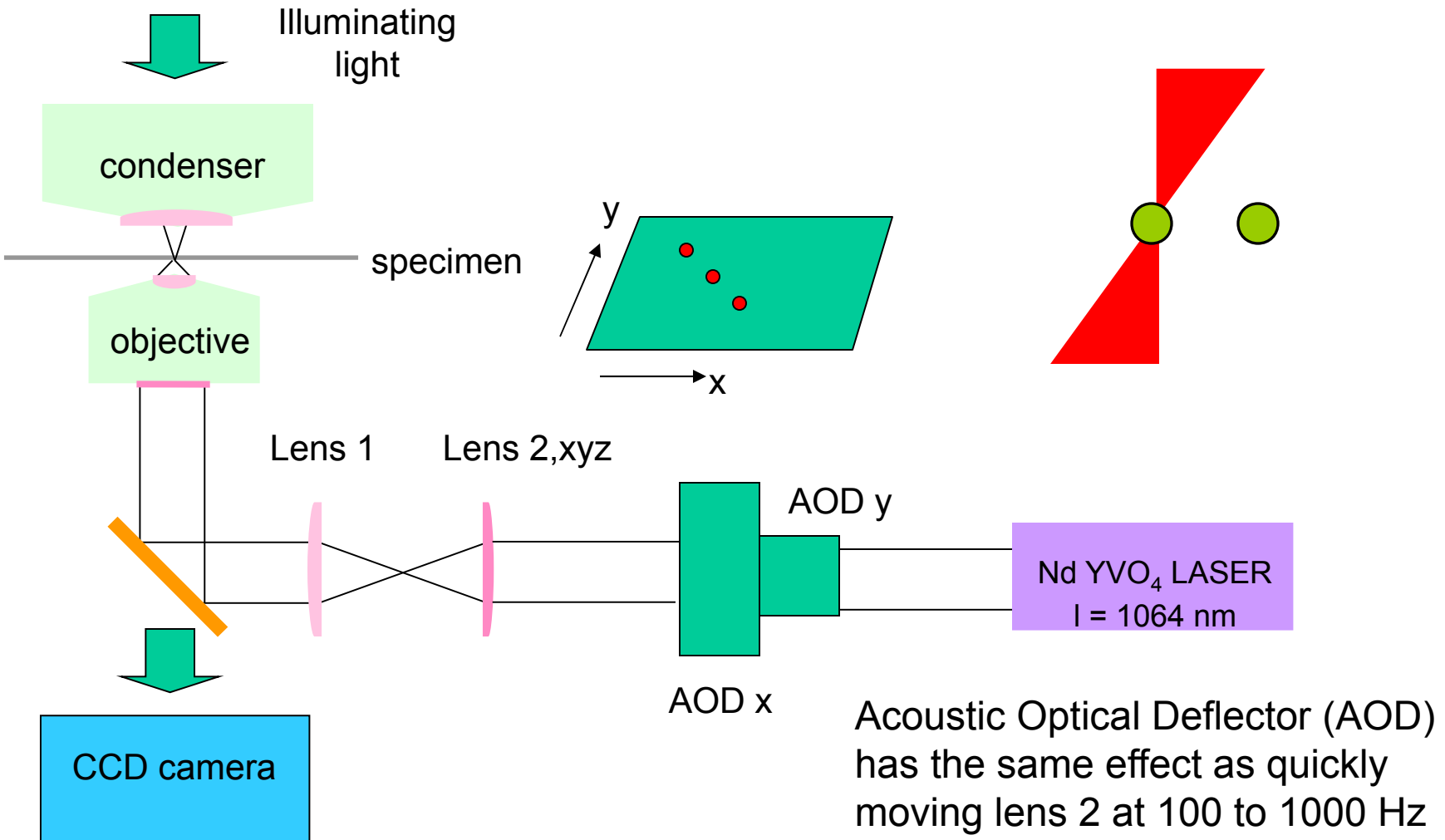
# Pinces multiples

Plusieurs pièges sont créés par partage du faisceau



# Pinces multiples

Plusieurs pièges sont créés par partage du faisceau

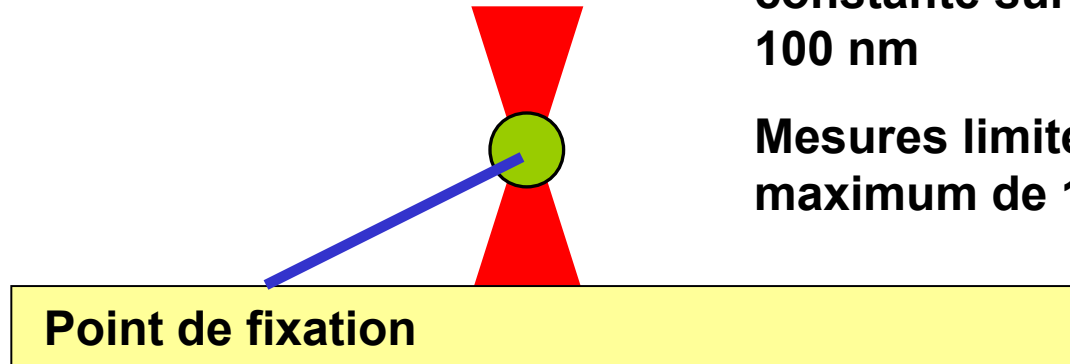


# Intensité des forces

$$F = -k x \quad (1 \text{ pN} / \text{nm})$$

La raideur  $k$  est constante sur plus de 100 nm

Mesures limitées à un maximum de 100 pN

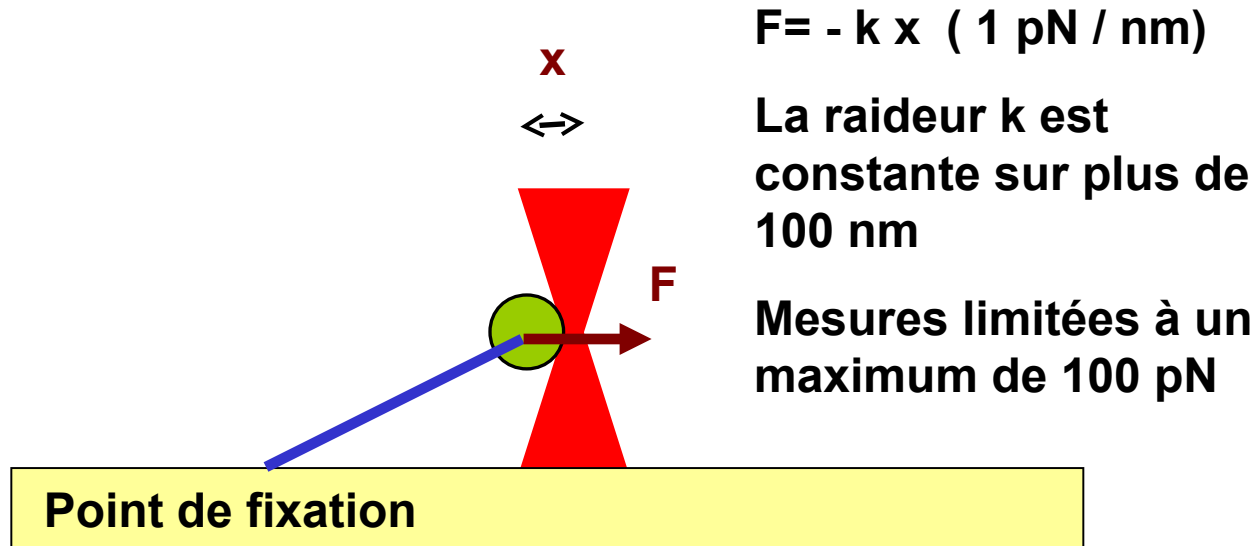


**Pico ( $10^{-12}$ ) Newton = force typique pour une molécule**

**1 pN = poids d'un globule rouge**

**6 pN = Force d'arrêt d'un petit moteur moléculaire**

# Intensité des forces

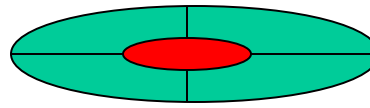


**Pico ( $10^{-12}$ ) Newton = force typique pour une molécule**

**1 pN = poids d'un globule rouge**

**6 pN = Force d'arrêt d'un petit moteur moléculaire**

Détection de position

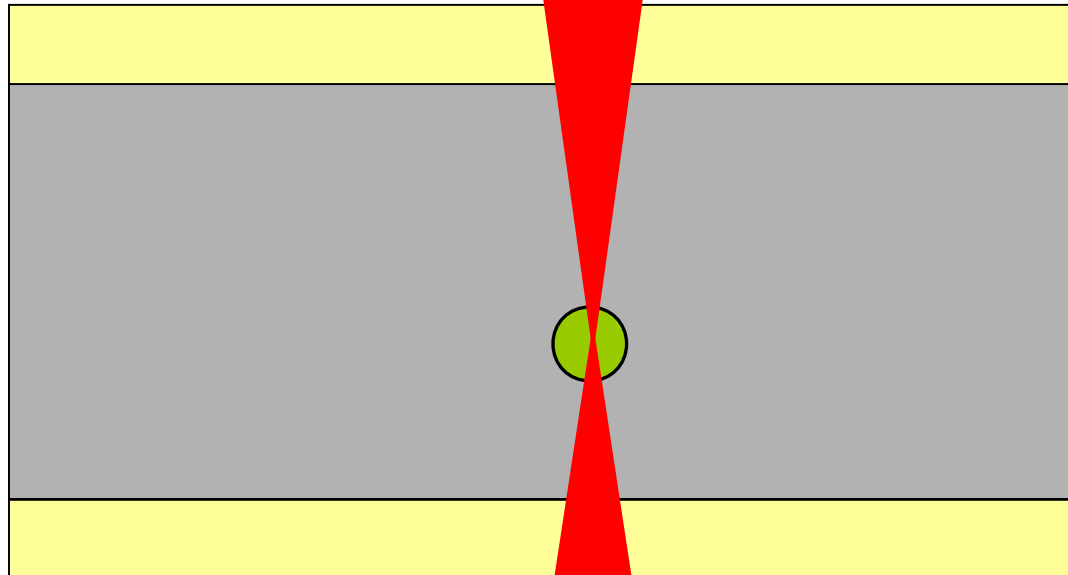


Extraction de la position  
x et y de la bille

Photo-détecteur



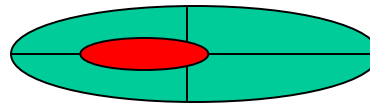
Condenseur



Source et lentilles



Détection de position

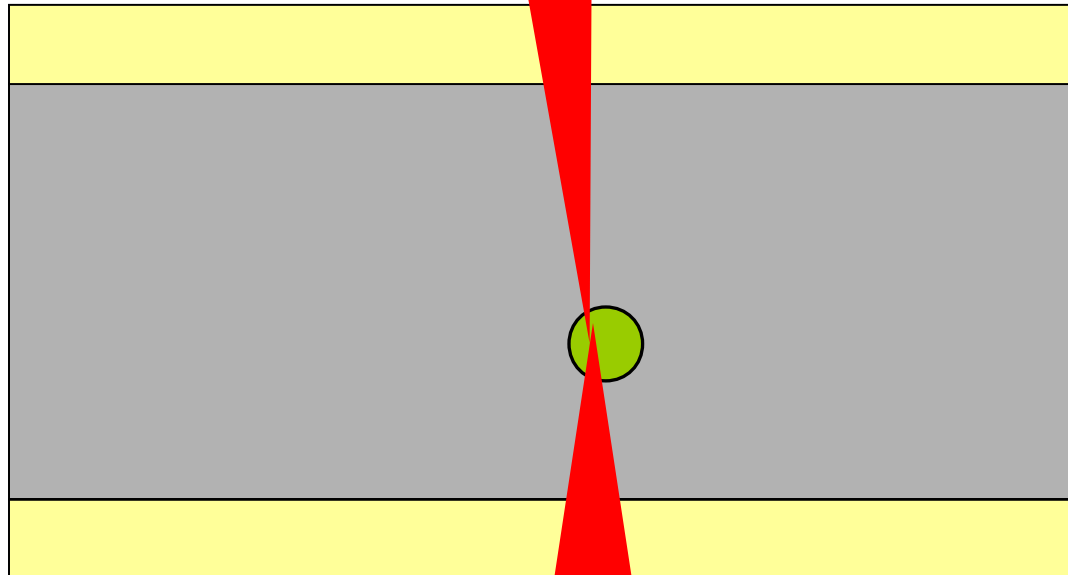


Extraction de la position  
x et y de la bille

Photo-détecteur

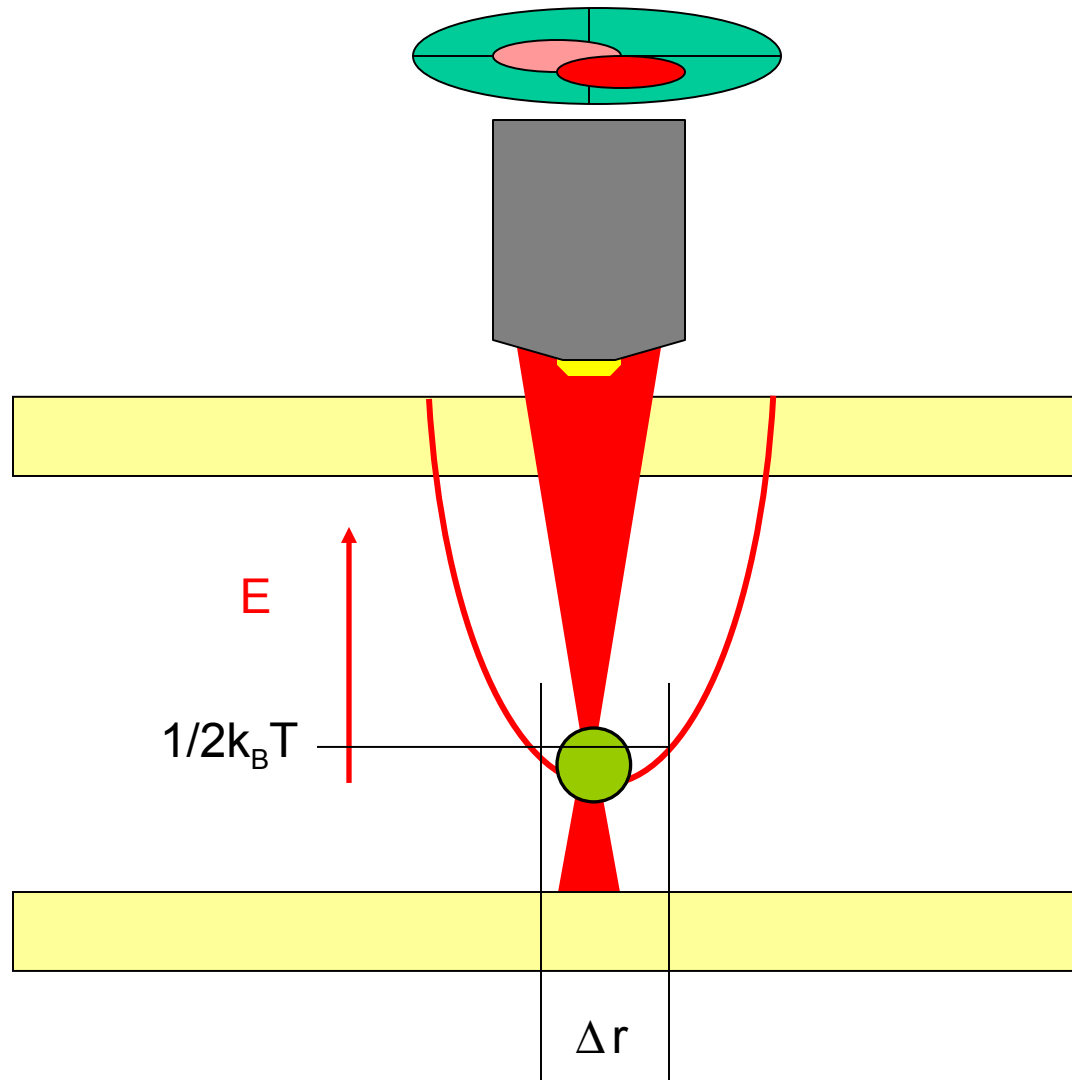


Condenseur



Source et lentilles

# Calibration



**A cause des fluctuations thermiques, la bille s'agite dans le puits de potentiel avec une énergie potentielle moyenne de  $\frac{1}{2} k_B T$  : en mesurant la distribution du déplacement quadratique moyen on obtient la constante  $k$  du piège (pN/nm)**

# Mesures optiques

- **détection optique d'une molécule unique**
  - mesure à basse température (1989)
  - mesure à température ambiante (1992-1994)
- **premières expériences sur des biomolécules *in vitro* :**
  - activité enzymatique d'une cholestérol oxydase (1998)
  - conformation de petites molécules d'ADN et ARN (1999)
  - activité d'une exonucléase (1999)
- **premières expériences *in vivo*:**
  - suivi de l'entrée d'un adéno-virus (2001)
  - diffusion latérale de canaux calciques (2001)
  - organisation membranaire de récepteurs dans des amibes *Dictyostelium discoideum* (2001)

# Forces sur des organelles

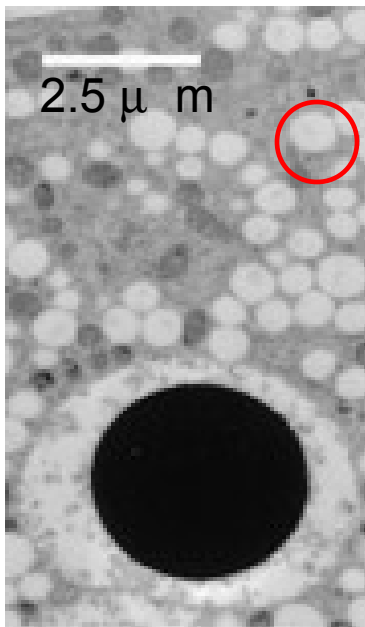
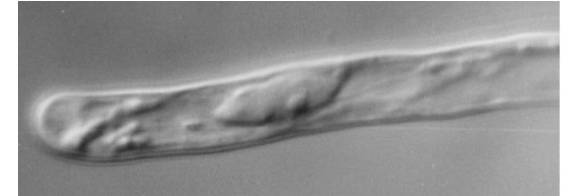
Prérequis pour le piégeage : contraste d'indice de réfraction

bactérie ou virus riche en protéines

chromosomes

ADN dense dans le noyau

Probleme: faible contraste d'indice



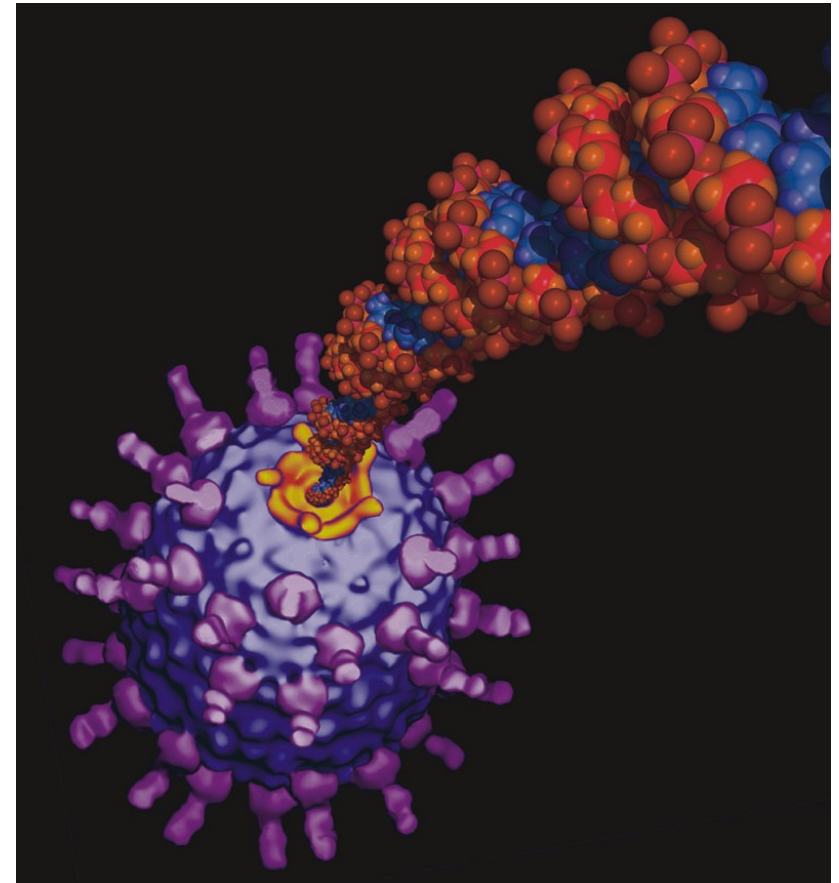
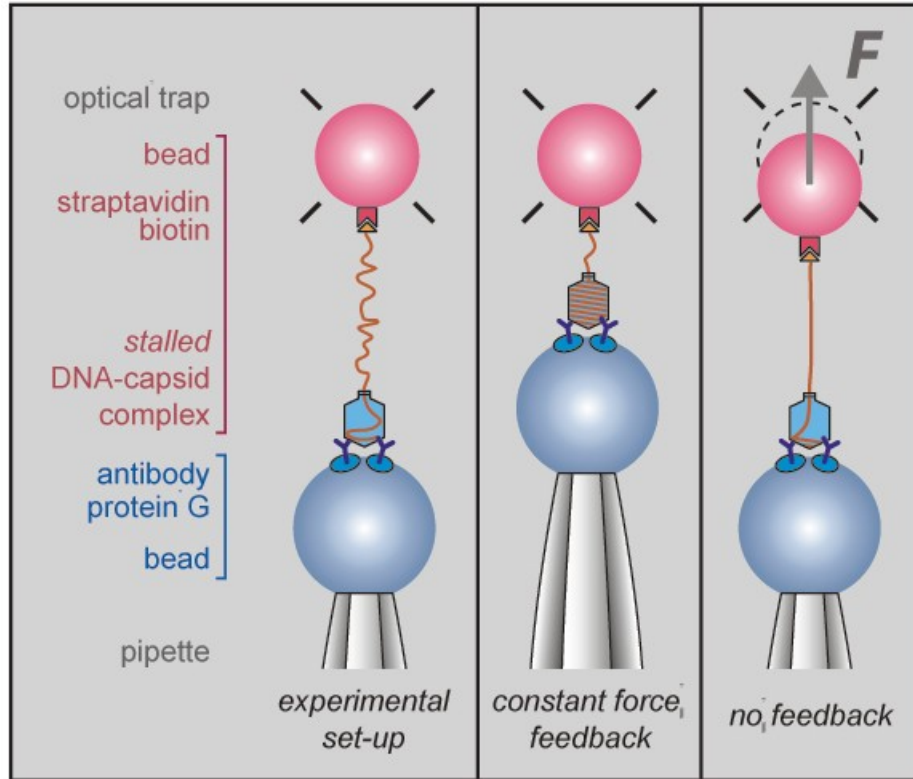
Embryons de drosophile

Vésicules transportés le long de  
microtubules

Welte et al, Cell, 2001

Mesures des forces sur les organelles in vivo difficiles

# Exemple d'application: encapsidation virale chez le bacteriophage $\phi 29$



**Micropipette pour la manipulation**

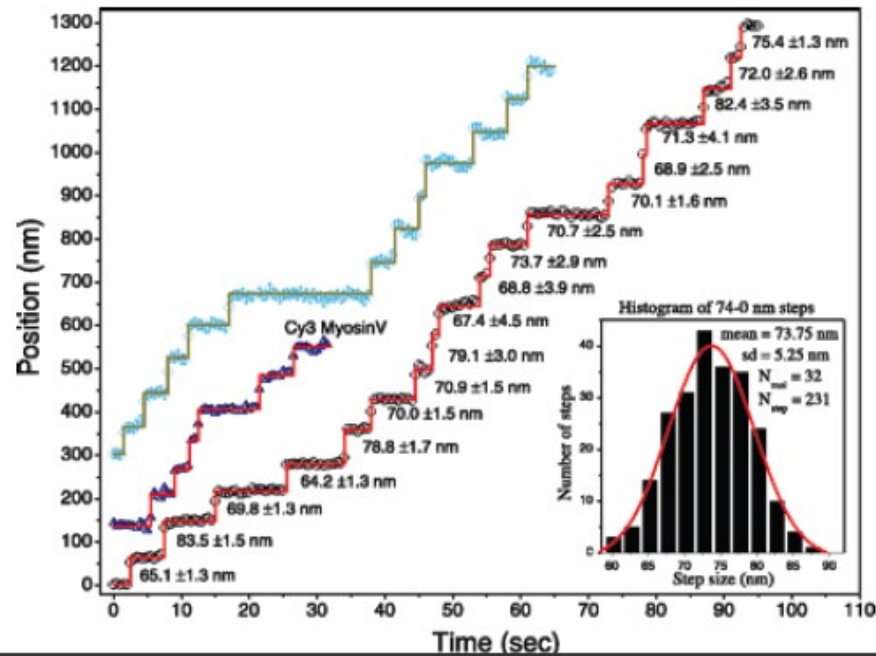
**6.6 micron ADN dans 42 x 54 nm capside.**

**Moteur exploite l'ATP: 57 pN**

**Vitesse d'encapsidation dépend du taux de remplissage**

**Smith et al, Nature, 2001**

# Déplacement de la Myosine V

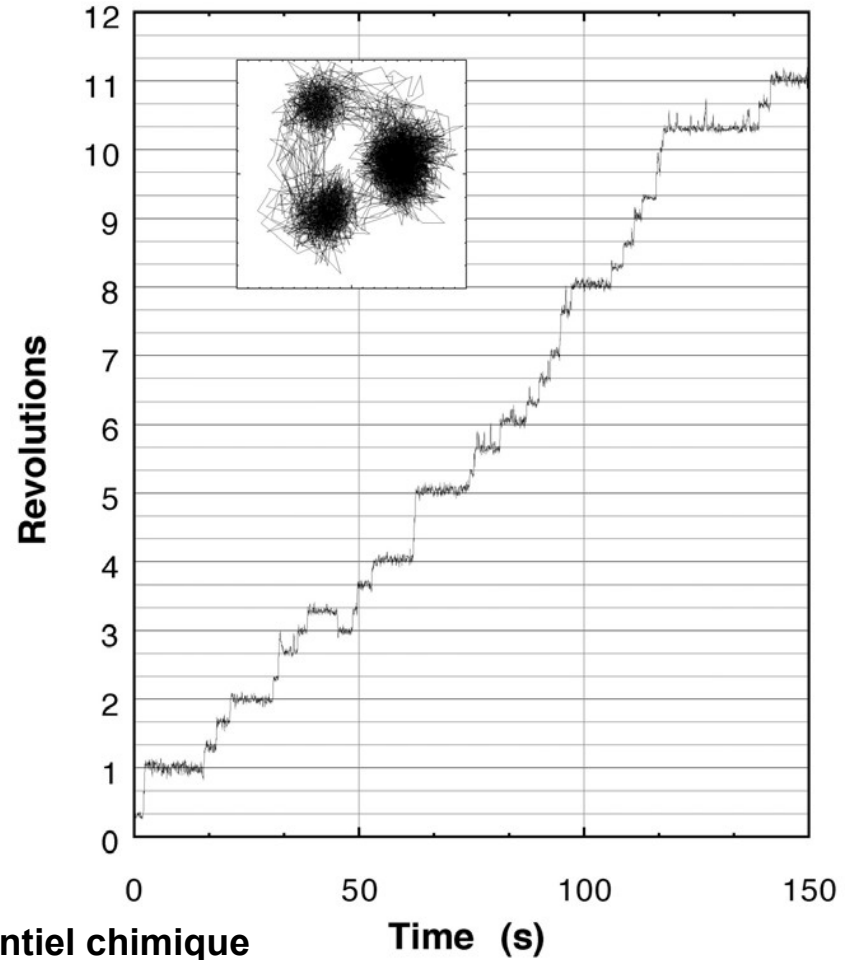
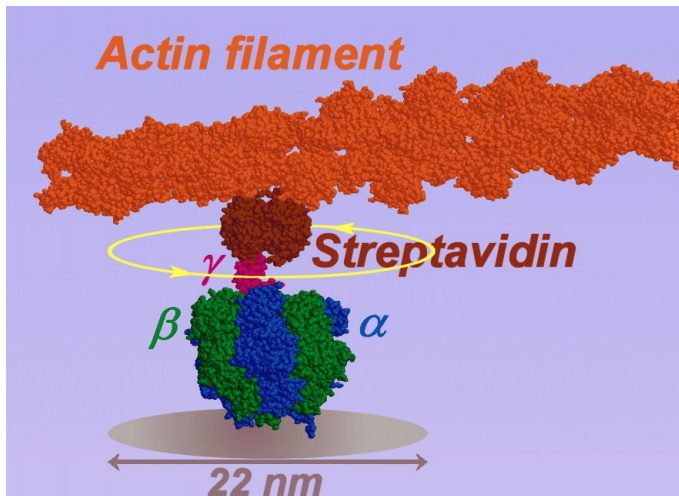


voir  
contraction.swf

# Déplacement de la Kinésine

Voir  
kinesine.mov

# Rotation de la F1ATPase



La F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase convertit une différence de potentiel chimique  
10 à 12 protons pour produire 3 ATP  
Efficacité du moteur rotatif ~ 100 %



# Résumé

**Les pinces optiques combinent la microscopie optique et la mesure de très faibles forces**

**Cet outil a révolutionné l'étude de molécules uniques en biophysique**

**Des déplacements de l'ordre du nano mètre et des forces de l'ordre de 0,1 pN peuvent être mesurées; on en tire les caractéristiques de nombreux moteurs moléculaires**

# MACHINES CELLULAIRES II

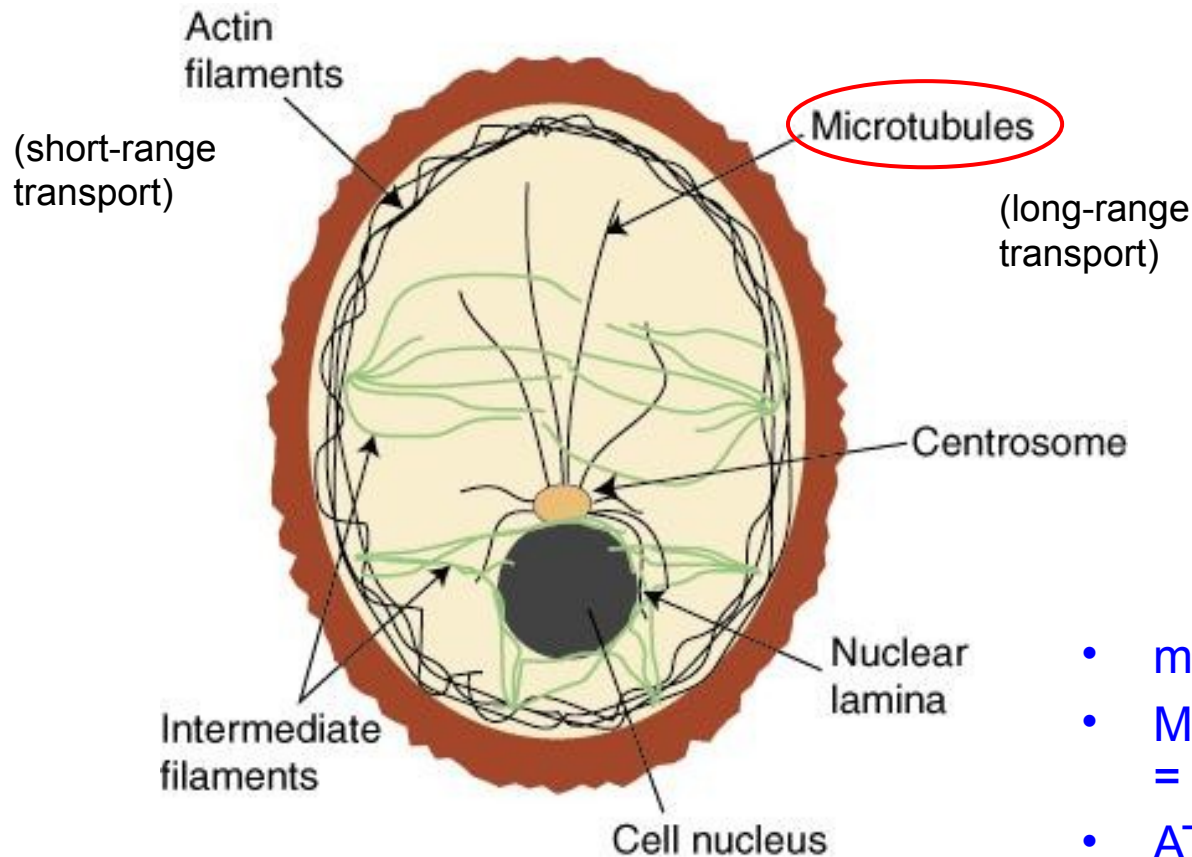
1. Mesure et production de forces microscopiques

2. **Traffic Intracellulaire**

3. Transport – Mobilité

4. Mouvement à faible nombre de Reynolds

# Transport actif au niveau de la cellule



- microtubule = autoroute
- Moteur moléculaire (protéines) = camions
- ATP = gazoil

# Moteurs moléculaires

**ADN, ARN** polymérase: se déplacer suivant l'ADN ; **dupliquer** and **transcrire** l'ADN en ARN

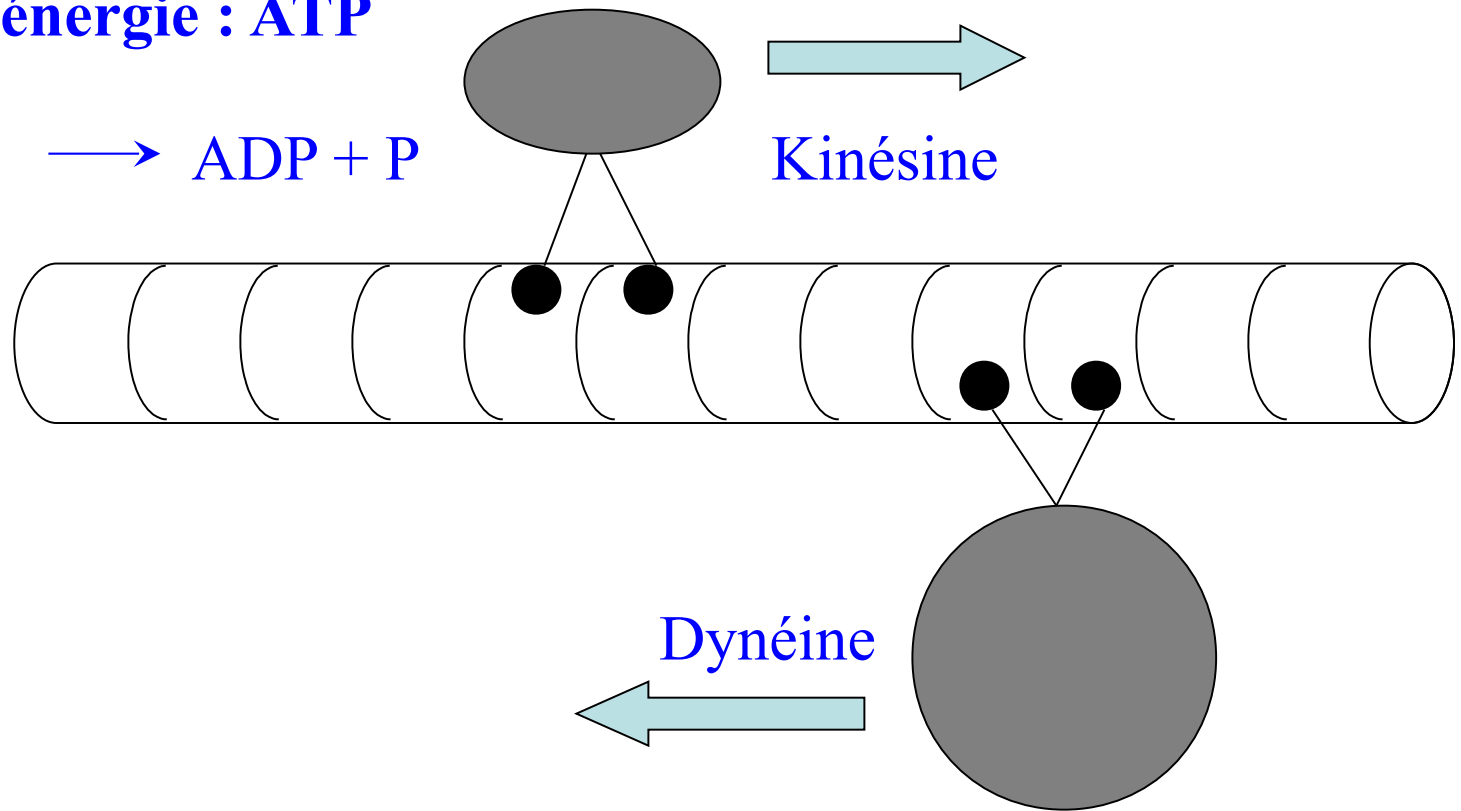
**Pompes membranaires**: transporter des ions et de petites molécules à travers les barrières membranaires

**Myosine**: travail collectif dans les muscles

**Kinésine, Dynéine**: moteurs pour le déplacement orienté suivant les filaments ; essentiels pour le transport actif intra-cellulaire, la motilité cellulaire, et la division cellulaire

# Kinésine et dynéine: moteurs du cytosquelette

## Monnaie d'énergie : ATP



- Multiples moteurs sur la même voie simultanément
- Taille du cargo  $\gg$  Taille du moteur
- Organisation régulée ou embouteillages ?

# Kinésine

Kinésine : longueur 80 nm, diamètre 5-15 nm

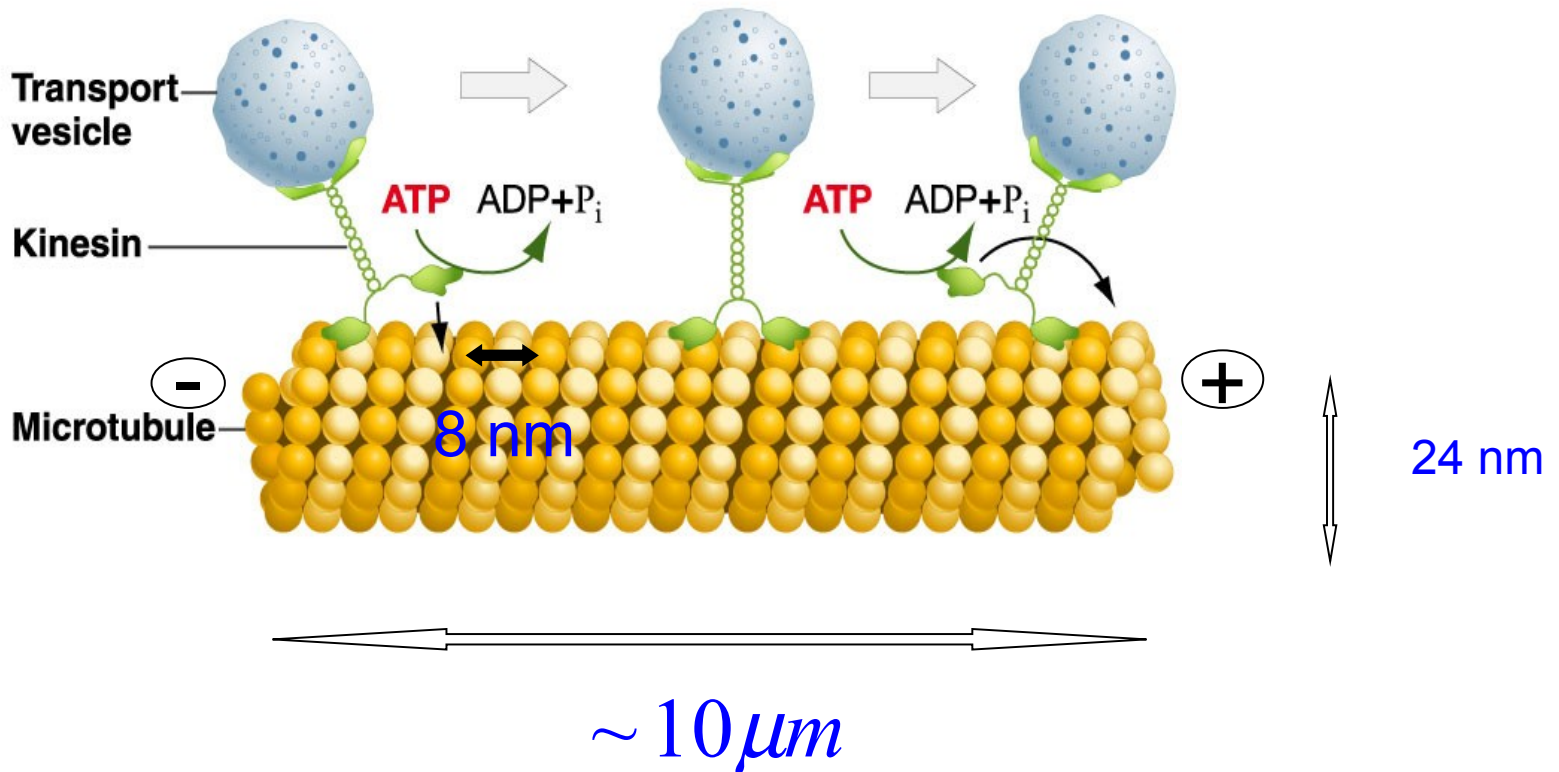
Molécule à 2 têtes (dimer)

effectue > 100 pas avant de se détacher suite aux fluctuations thermiques (1 pas = 8nm)

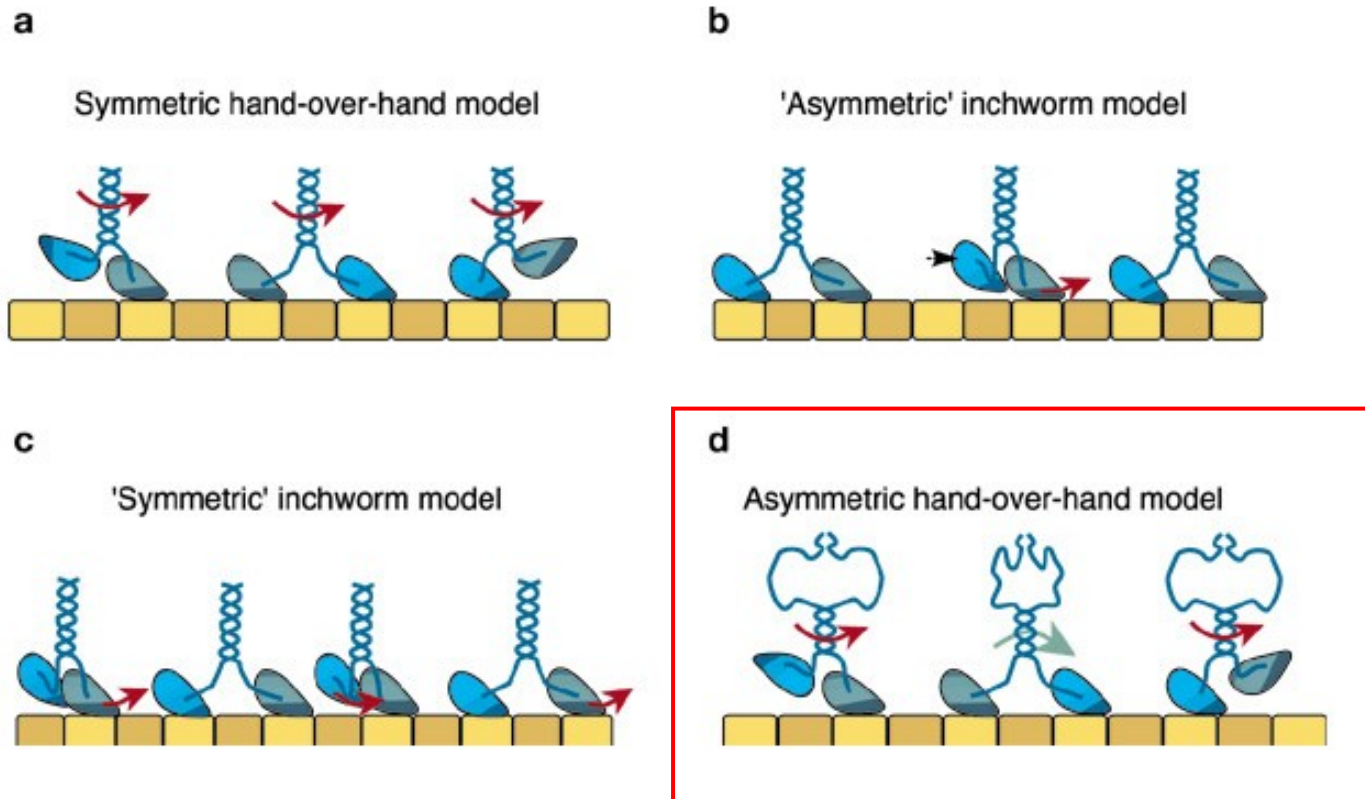
Vitesse :  $\sim 1.5 \mu\text{ m/s}$

# Microtubules et Kinésine

Kinesin "walks" along a microtubule track



# Mécanismes possibles du mouvement

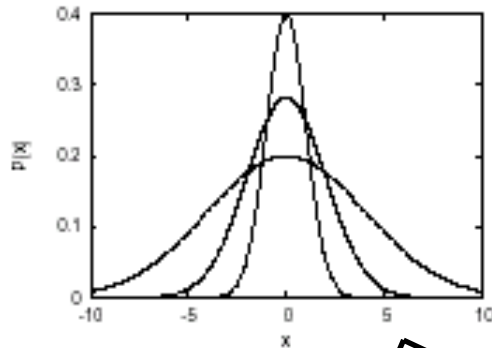


**inchworm:** toujours la même tête en avant

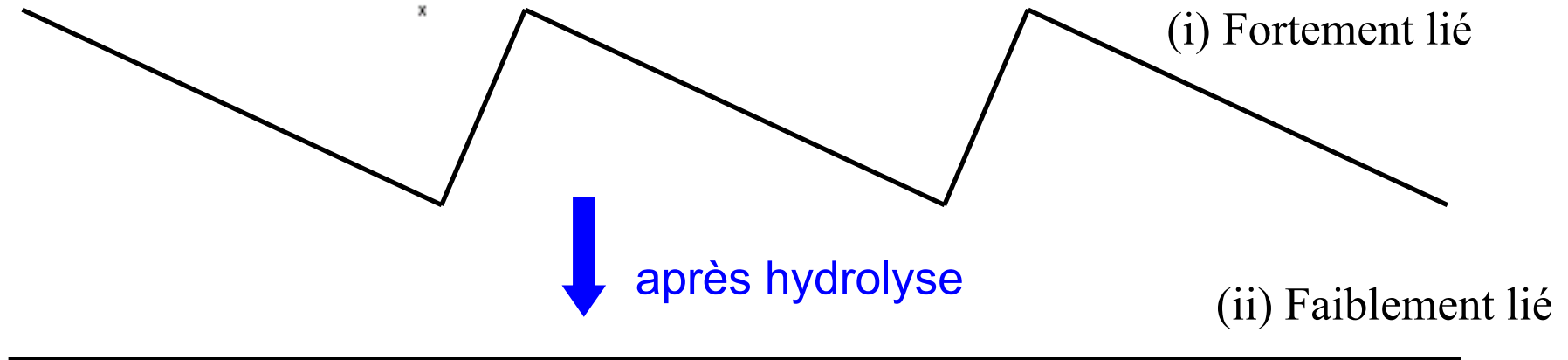
**hand-over-hand:** chaque tête passe en avant à son tour



# Intervention d'un cliquet pour la directionalité



Cliquet brownien pour le  
moteur KIF1A à une tête



Étapes :

(i) Cliquet en marche

(ii) diffusion

# Maladies liées aux moteurs moléculaires

## Défaut des Kinésines

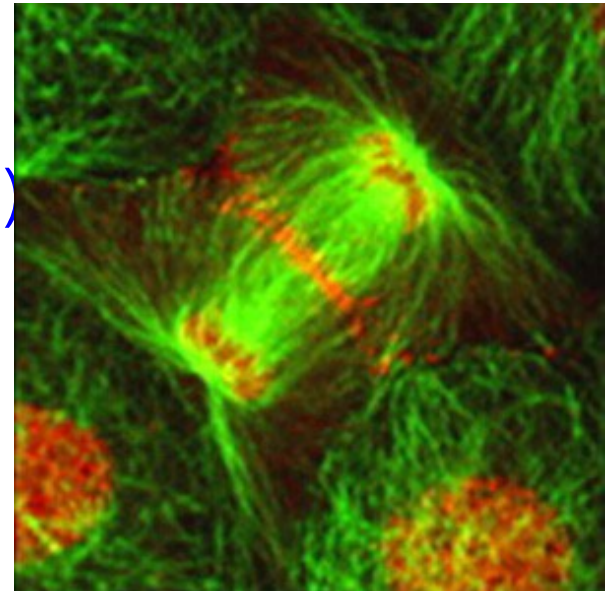
Désordres neurologiques

Perte de fertilité

Aneuploidie (aberration des chromosomes)

## Défaut des Dynéines

ALS (Sclérose latérale amyotrophique)



# Importance en recherche bio-medicale

Maladie	Moteur	Symptomes
Charcot-Marie	KIF1B kinésine	Maladie neurologique; perte de sensations
Retinitis pigmentosa	KIF3A kinésine	Perte de la vue
Syndrome d'Usher	Myosine VII	Perte de l'audition
Maladie de Griscelli	Myosine V	Défaut de pigmentation
Primary ciliary diskenesia/ Syndrome de Kartageners	Dynéine	Maladie des sinus et des poumons, infertilité male

# MACHINES CELLULAIRES II

1. Mesure et production de forces microscopiques
2. Traffic Intracellulaire
3. Transport – Mobilité
4. Mouvement à faible nombre de Reynolds

# Transport dans les systèmes biologiques

Assemblages d'animaux

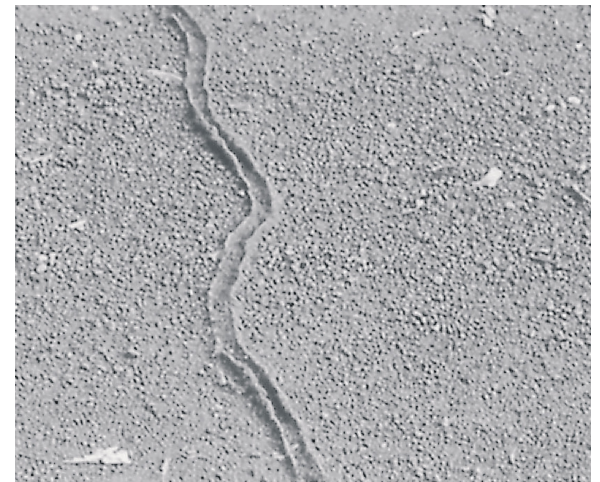
Souvent mouvement synchronisé, sans chef

Structures "auto-organisées" qui évitent la dispersion (pas de diffusion)



# Routes engendrées par les fourmis

**Système de chemins “sans intelligence centrale”**



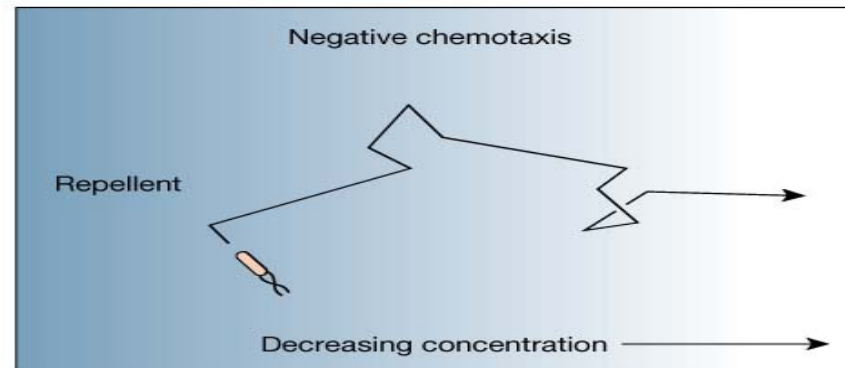
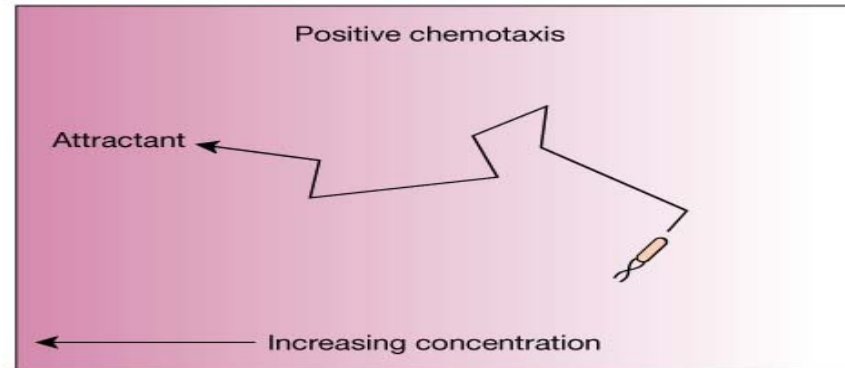
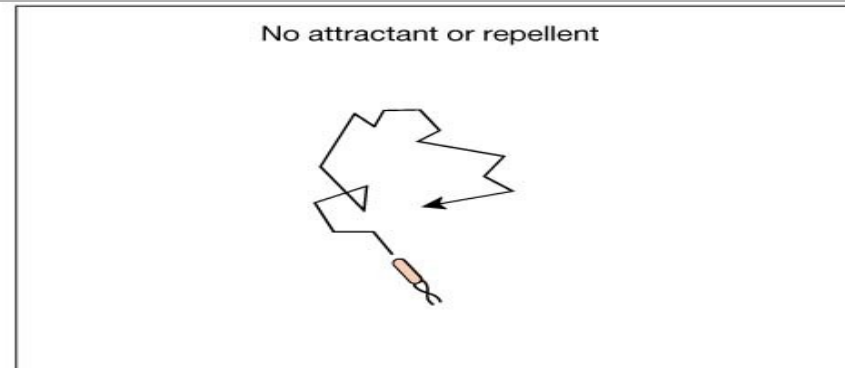
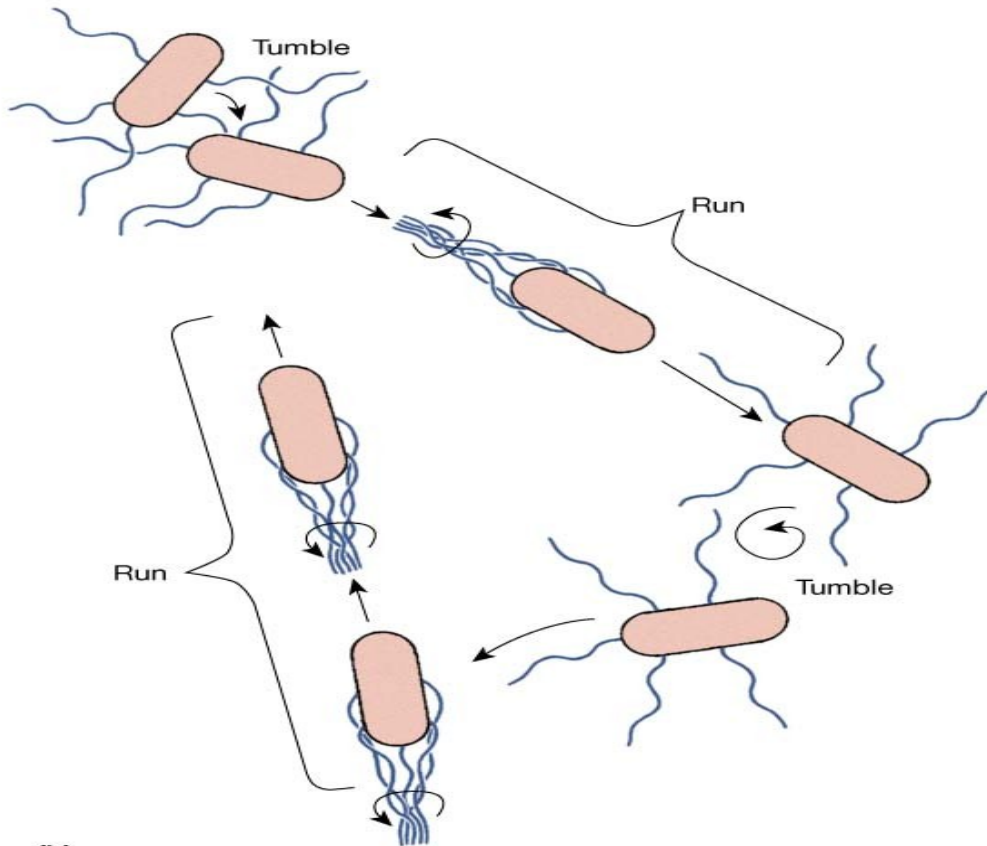
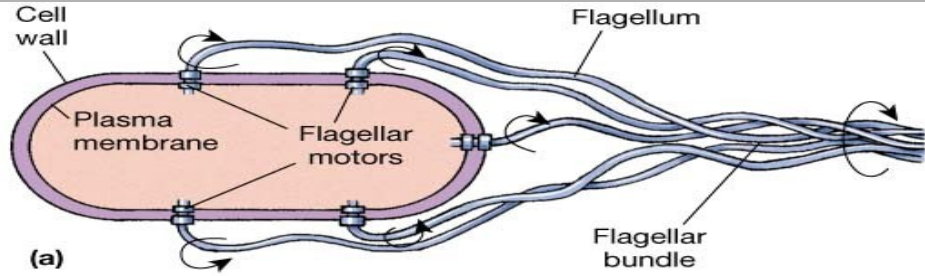
# Chémotaxie

La “communication” se fait par voie chimique et après les règles simples pour chaque fourmi donnent lieu à un comportement collectif

Les fourmis laissent une trace de phéromones qui est détectée par les autres et permet d'indiquer la présence de nourriture à distance



# Motilité des cellules individuelles : flagelles

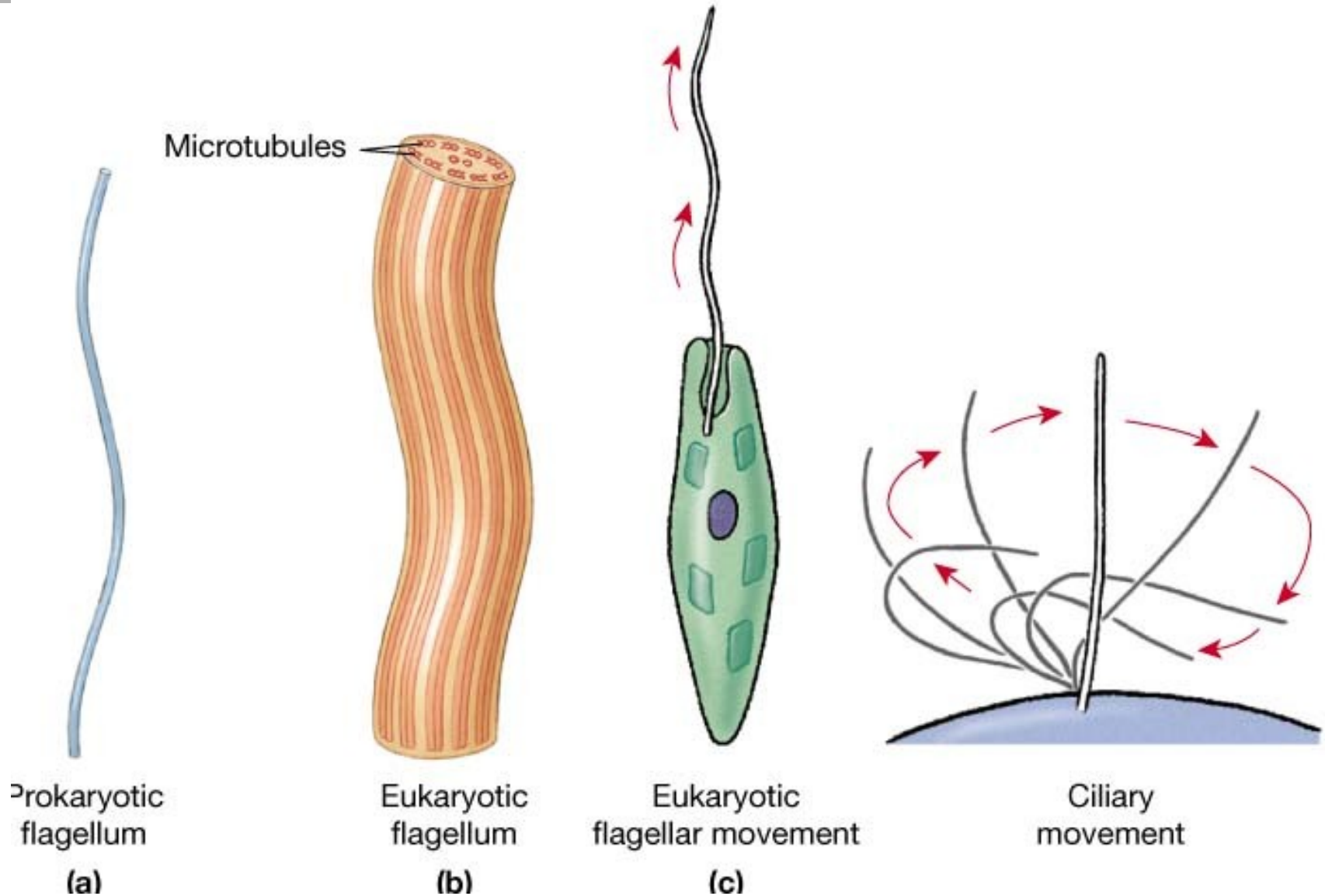


(b)

(c)

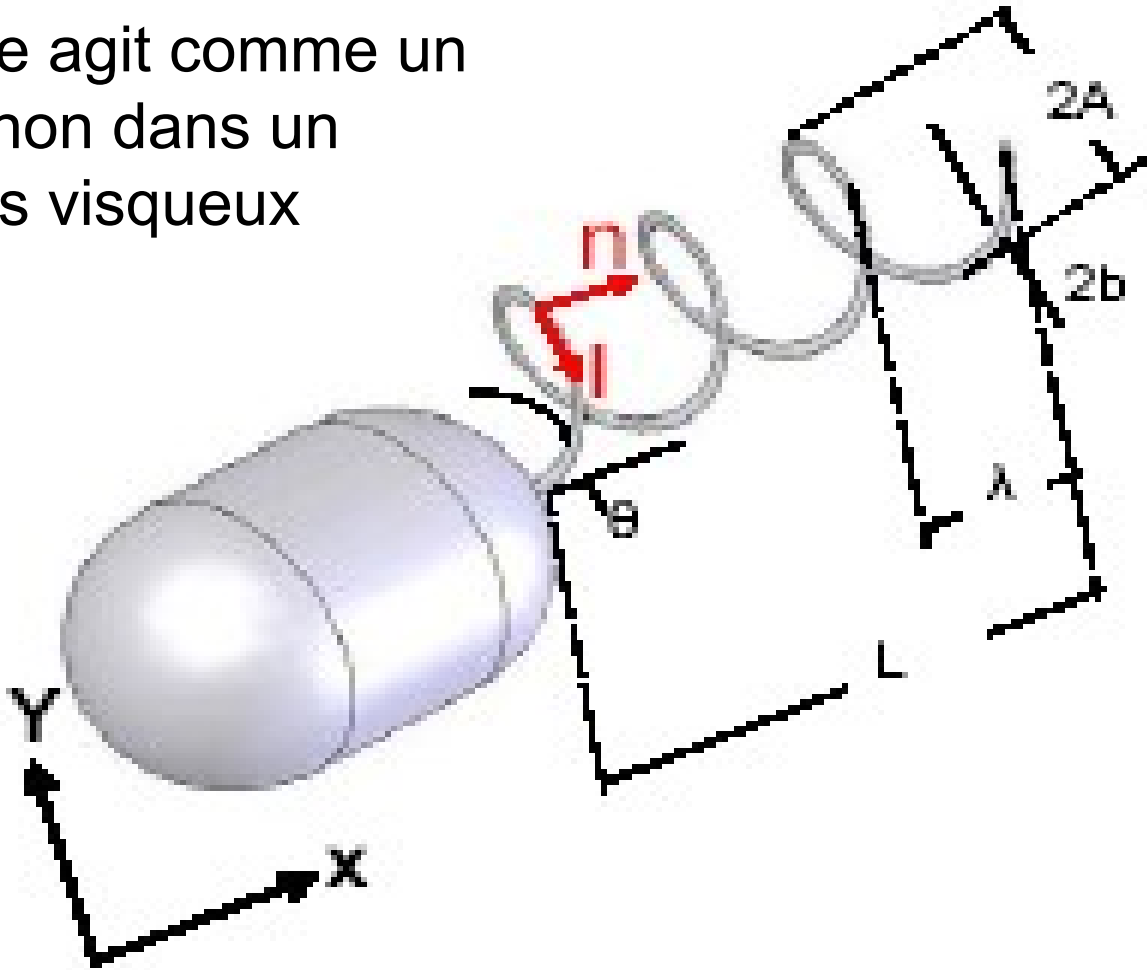


# Diversité de systèmes pour la motilité



# Fonctionnement

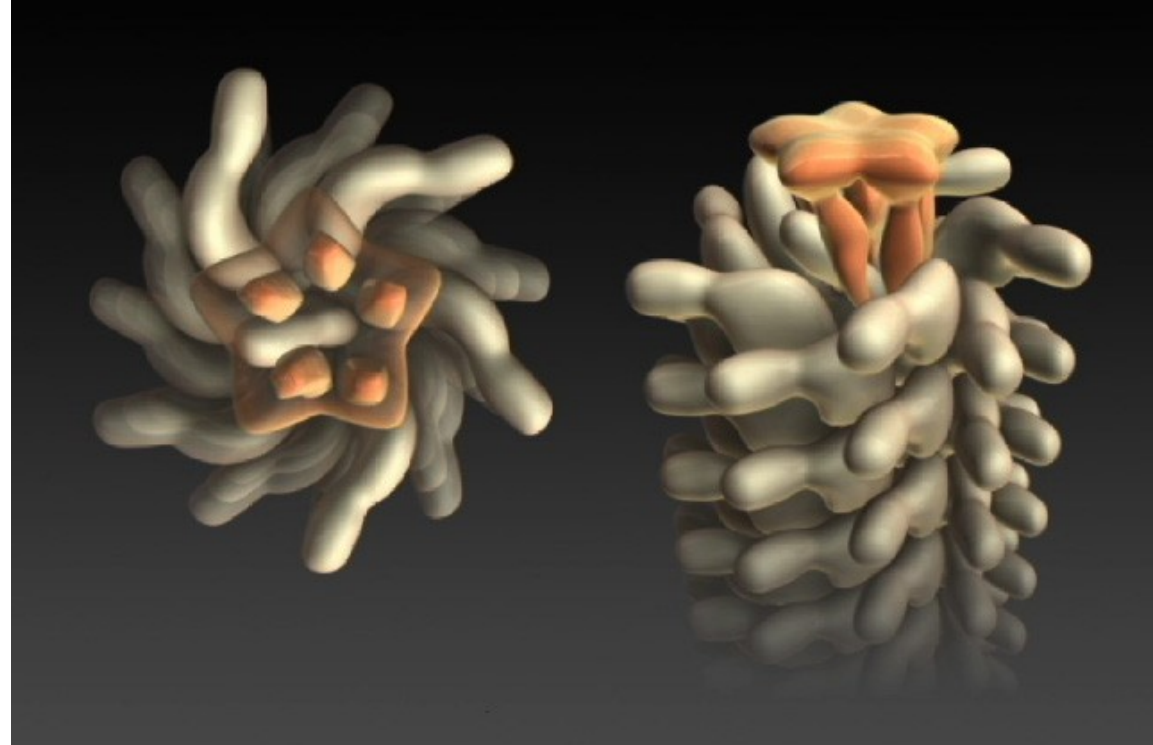
Le flagelle agit comme un  
tire-bouchon dans un  
milieu très visqueux



# Structure d'un flagelle



Structure of bacterial flagellar filament as revealed by X-ray fiber diffraction



## **Salmonelle**

### **Moteur rotatif**

**10 nm dia. x 10,000 nm (helice)**

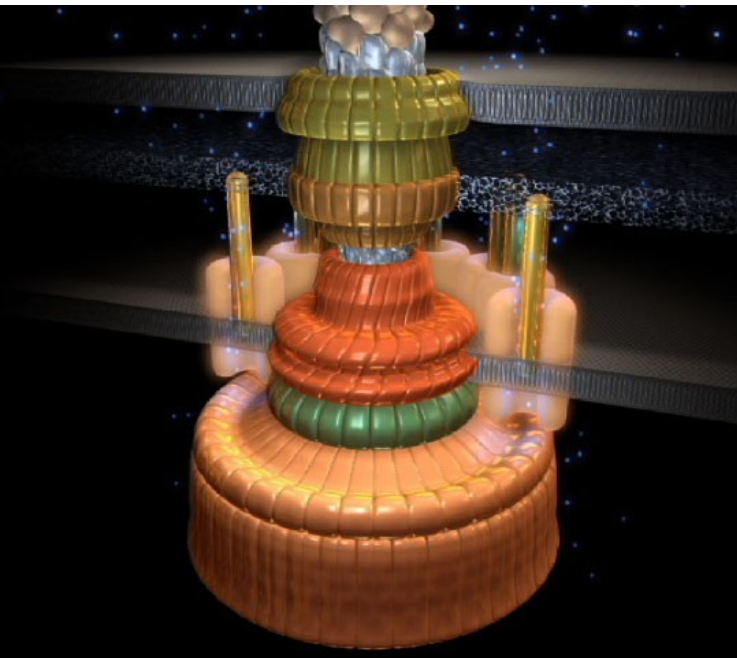
**20,000 rpm; inversion en 1 msec**

**$10^{-16}$  watts**

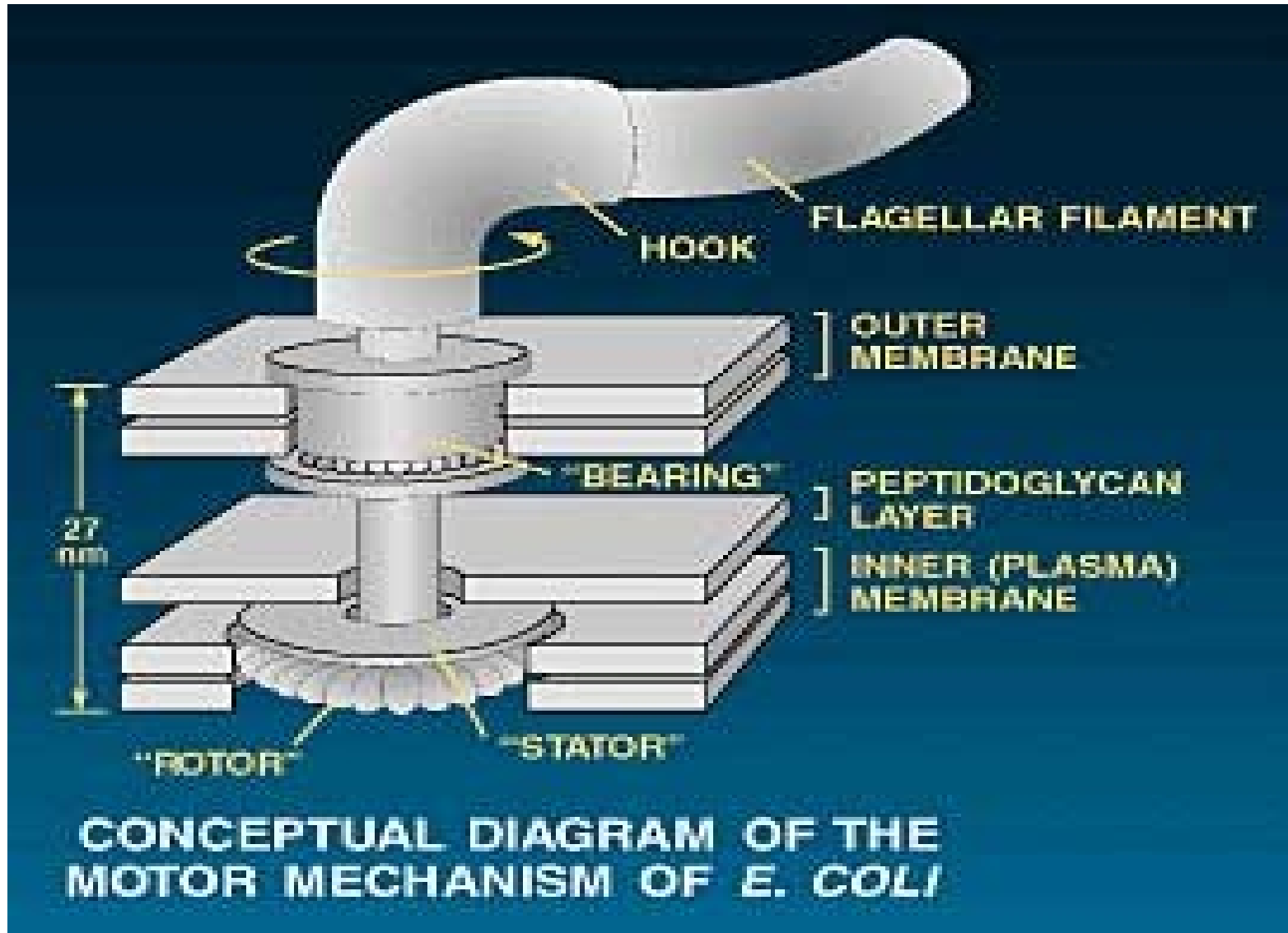
**force motrice: protons**

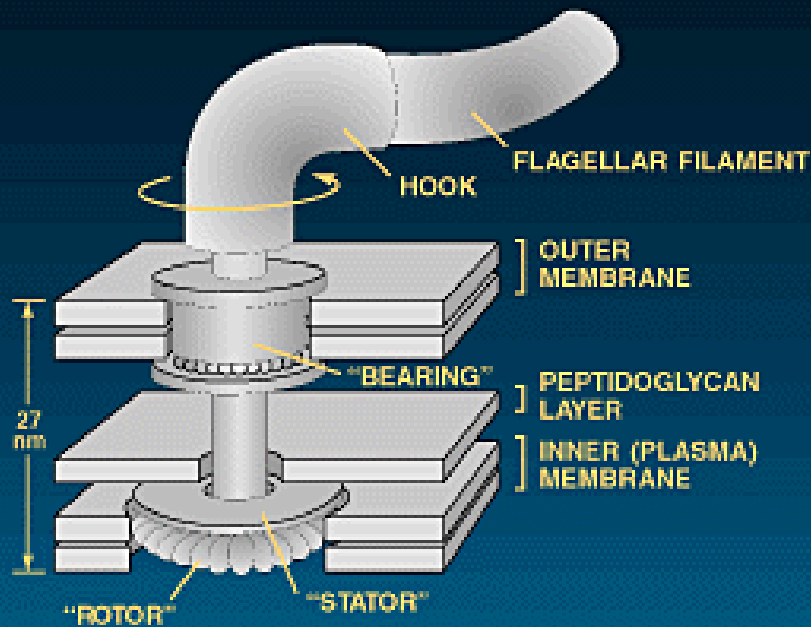
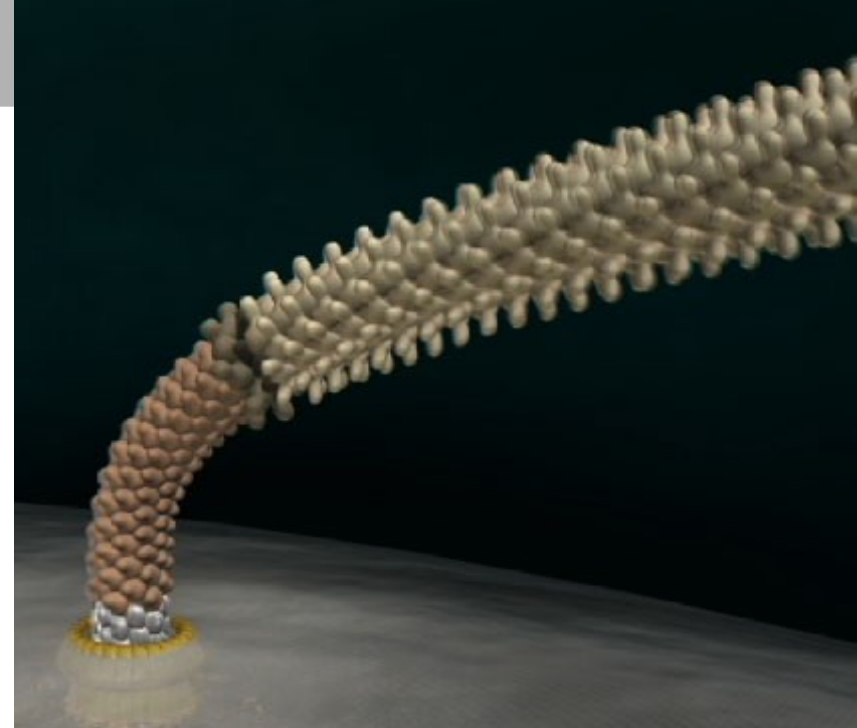
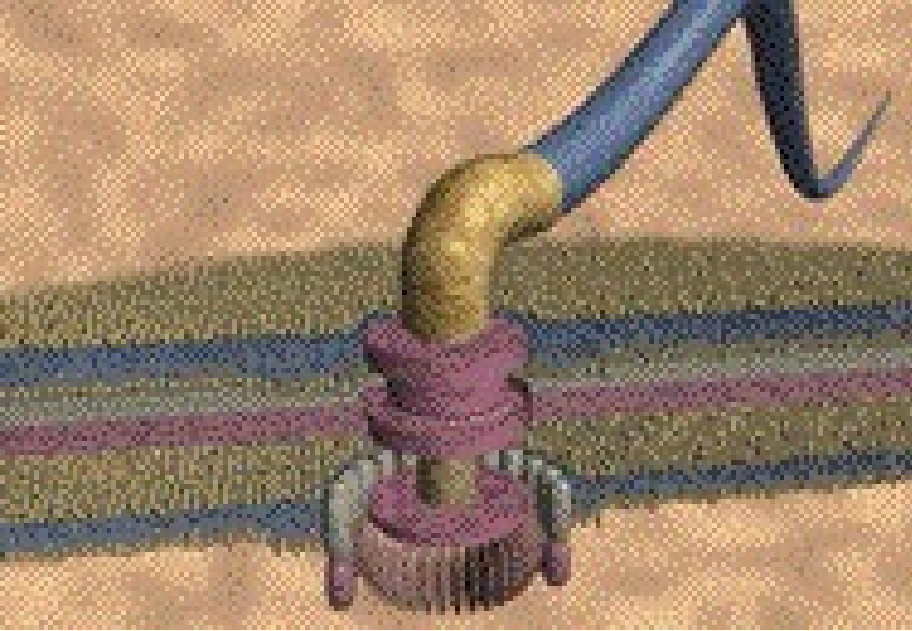
**80% efficacite**

**~30 proteines, plusieurs de dizaines de K**

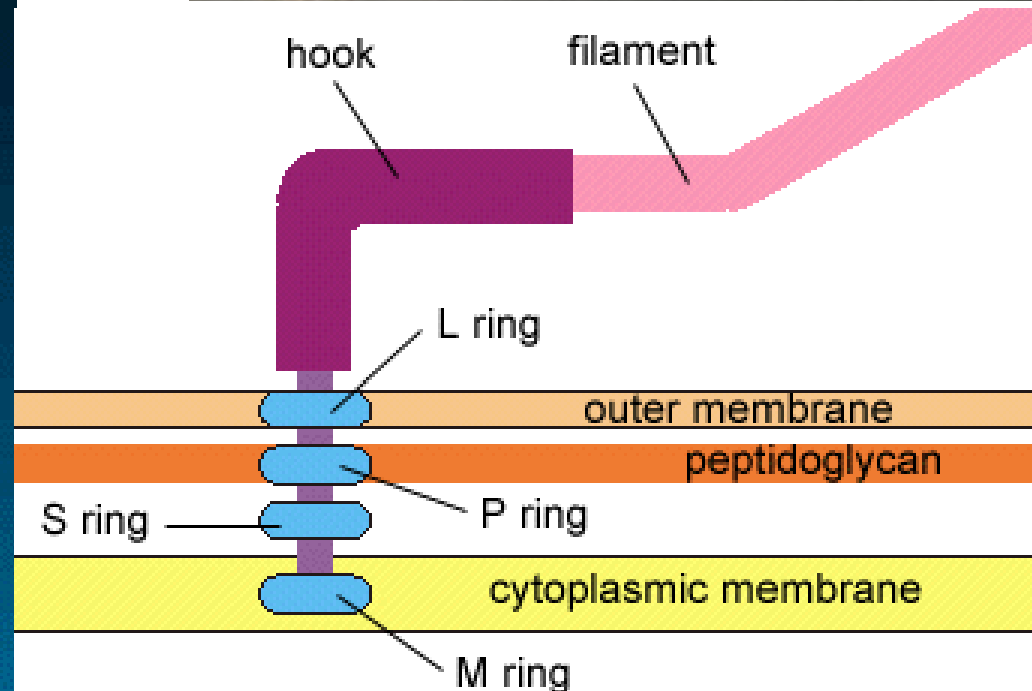


# Le moteur MOT A<sub>4</sub> B<sub>2</sub>





CONCEPTUAL DIAGRAM OF THE MOTOR MECHANISM OF *E. COLI*



# Caractéristiques physiques du moteur de E. Coli

Il utilise l'énergie électrochimique des protons

En marche normale il faut environ 1000 protons par tour

Energie extraite par proton:  $6 \text{ kT}$  ( $2,5 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ )

Couple produit en fonction de la vitesse : dégradation

douce jusqu'à 200 Hz ; couple nul à 300 Hz

Couple d'arrêt :  $4 \cdot 10^{-18} \text{ Nm}$

Puissance maximale :  $10^{-15} \text{ Watt}$

Efficacité : entre 5% et 50%

Une rotation est décomposée en environ 50 « pas »

# MACHINES CELLULAIRES II

1. Mesure et production de forces microscopiques
2. Traffic Intracellulaire
3. Transport – Mobilité
4. Mouvement à faible nombre de Reynolds



## Nombre de Reynolds et Force de Stokes (au tableau)



$Re \ll 1$ , les mouvements sont réversibles dans le temps

Voir  
réversibilité.avi

C'est dur d'avancer quand  $Re \ll 1$  !

Voir  
Théorème-StJacques.mp4

Théorème de la coquille Saint Jacques : Ce n'est pas possible de bouger avec un seul degré de liberté. (réversibilité, indépendant de la vitesse)

Ajoutons un second degré de liberté...

Voir  
bactérie artificielle.wmv

A vous de jouer !

LA COQUILLE SAINT JACQUES

Voir  
scallop.mp4

Il suffit de deux feuilles de papier...