

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTE

T H E S E

en vue d'obtenir le titre de

Docteur en Sciences

d'Aix-Marseille Université

Spécialité : Biophysique

Présentée et soutenue le 31 mai 2013 par

Olivier BLANC

Mesure in vivo de la mécanique cellulaire lors de la morphogénèse d'un tissu

Thèse dirigée par Pierre-François LENNE

préparée à l'Institut de Biologie du Développement de Marseille

Luminy (Marseille)

Jury :

Rapporteurs : Hélène DELANOË-AYARI
François GRANER

Directeur : Pierre-François LENNE

Examineurs : Maité COPPEY-MOISANS
Julien ROYET

Table des matières

I	Contexte et Objectifs	1
0.1	Mécanique de la morphogénèse tissulaire.	3
0.1.1	Morphogénèse épithéliale	3
0.2	Mécanique des jonctions cellulaires	5
0.2.1	Origine moléculaire des forces	8
0.2.2	Mécanique des jonctions cellulaires	11
0.3	Objectifs	12
II	Méthodologie	13
1	Méthodologies et approches existantes	15
1.1	Méthodologies quantitatives	15
1.1.1	Par contact direct.	15
1.1.2	Méthodes intracellulaires passives	16
1.1.3	Méthodes actives sans contact mécanique.	17
1.2	Approches in vivo	18
1.2.1	Ablation laser	18
1.2.2	Méthodes d'inférences.	19
2	Mesures micro-rhéologiques in-vivo	21
2.1	Utilisation d'une pince magnétique?	21
2.2	Imagerie microscopique de l'embryon	23
2.2.1	Préparation de l'échantillon	23
2.2.2	Considérations opto-mécaniques	24
2.2.3	Contraintes optiques de l'embryon	25
2.2.4	Sondes mécaniques.	26
2.3	Cahier des charges	33
3	Dispositif expérimental	35
3.1	Montage optique	35
3.1.1	Mode d'illumination	38
3.1.2	Détection à deux caméras	40
3.1.3	Contrôle et acquisition des données brutes.	40
3.1.4	Contrôle de la pince optique	42
3.1.5	Pré-traitement des données	44

3.2	Suivi de particules	46
3.2.1	Diffusion et propriétés mécaniques	47
3.2.2	Déplacement carré moyen	48
3.2.3	Différenciation des types de mouvements	53
3.2.4	Calibration	55
3.2.5	Protocole d'acquisition et d'analyse	57
3.3	Pince optique	58
3.3.1	Principe	58
3.3.2	Photo-toxicité et échauffement local	62
3.3.3	Détecteur de position	64
3.3.4	Calibration de la pince optique	67
3.3.5	Pince optique : bilan	71
III	Résultats et discussion	73
4	Suivi de Particules	75
4.1	Paramètres Généraux d'acquisition	75
4.2	Différents types de mouvement	76
4.3	Mesures de viscosités	77
4.4	Discussion	79
5	Expériences de pinces optiques in vivo	85
5.1	Mesure de la rigidité des jonctions	86
5.2	Mesures des tensions jonctionnelles	92
5.3	Propagation d'une déformation locale	94
5.3.1	Détection synchrone	96
5.3.2	Application et mesures in vivo	103
6	Conclusions et perspectives	107
6.1	Suivi de particules	108
6.1.1	Améliorations techniques.	108
6.1.2	Mécanique et organisation du cytosquelette	109
6.2	Pinces optiques	110
6.2.1	Aspects techniques	110
6.3	Applications aux mesures des propriétés mécaniques	112

Première partie
Contexte et Objectifs

0.1 Mécanique de la morphogénèse tissulaire.

La morphogénèse désigne l'ensemble des mécanismes qui déterminent la forme d'un organisme. Son étude s'attache en particulier à la formation des tissus dans l'embryon.

0.1.1 Morphogénèse épithéliale

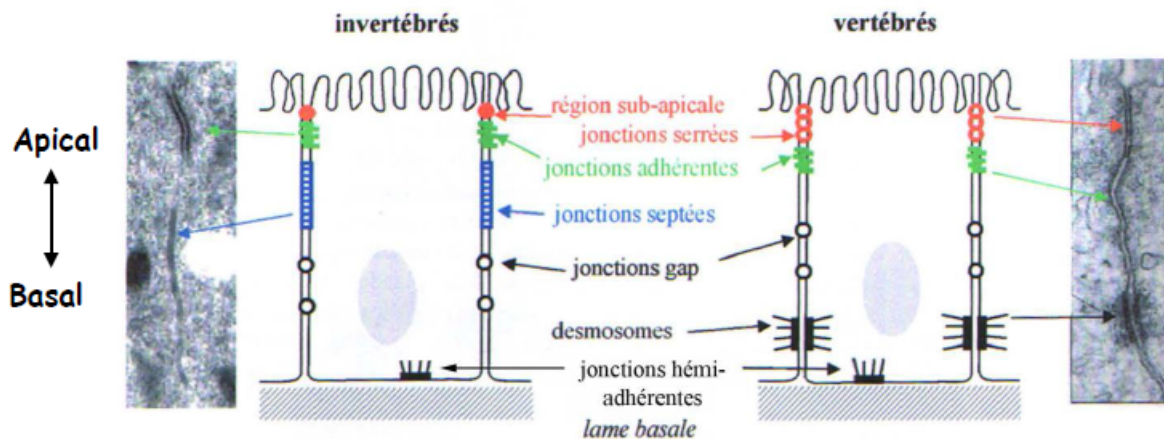


FIGURE 1 – Représentation d'un épithélium. Image adaptée de (CAVEY et al. 2008)

Durant les premiers stades de développement (gastrulation), on observe la mise en place de feuilletts embryonnaires différenciés selon une disposition spécifique préfigurant l'organisation du futur embryon. Ces feuilletts sont des épithéliums. Il s'agit d'une structure majeure de tout organisme. Ils agissent en tant que frontière/barrière entre deux environnements chimiques distincts, et définissent l'intérieur et l'extérieur. Ils protègent l'intérieur de l'extérieur tout en permettant un échange de matière contrôlé (passage des nutriments dans l'intestin, de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans les veines...). Ils se composent d'un feuillet de cellules conjointes et adhérant fermement les unes aux autres. En outre, en tant que barrière, ils présentent une polarisation intrinsèque : la partie des cellules proche de l'extérieur est nommée "apicale", et son opposée, en contact avec le reste de l'organisme, est appelée "basale". Ces cellules présentent donc une polarité dite apico-basale. En raison des rôles différents endossés par chacun des pôles, ces cellules présentent donc des structures/compositions protéiques différentes, comme on peut le voir sur la **figure (1)**.

Au cours de la morphogénèse, on peut observer des changements drastiques de forme des tissus. Ces processus impliquent des mécanismes aussi variés que les migrations cellulaires, réorganisation des cellules, élongation, invagination, comme illustré en **figure (2)**. Malgré la variété des processus, les cellules conservent leur adhésion les unes aux autres, afin de conserver leur rôle de barrière.

La *Drosophila* est un animal modèle majeur pour l'étude de la morphogénèse épithéliale. Je vais en présenter ici deux exemples observés lors de la première étape du

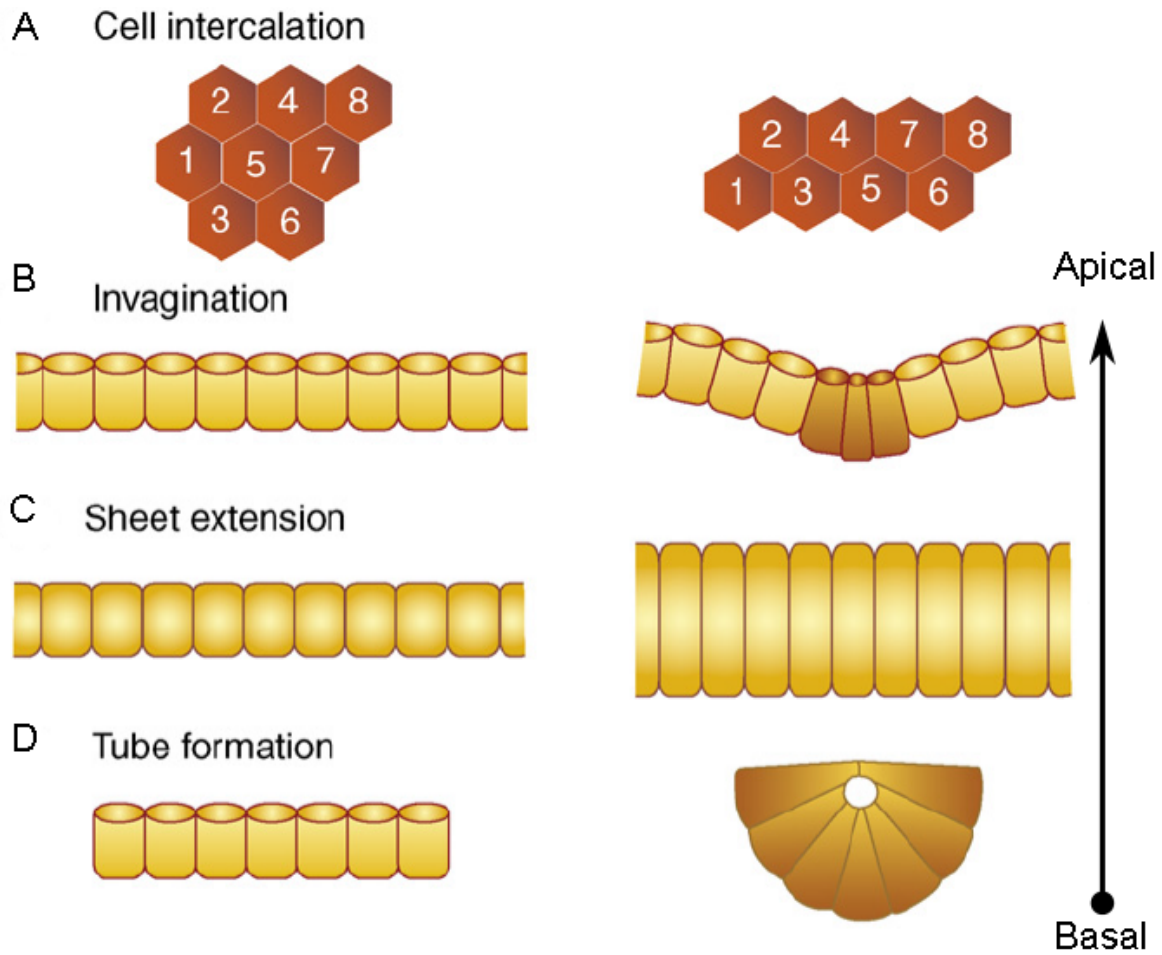


FIGURE 2 – Illustration des différents processus morphogénétiques observés dans les tissus épithéliaux. (QUINTIN, GALLY et LABOUESSE 2008)

développement de l'embryon. Chacun d'eux illustre un mécanisme typique de la morphogénèse épithéliale : l'invagination (**figure (2) (C)**) et l'intercalation (**figure (2) (A)**).

La gastrulation commence chez la drosophile juste après l'étape de cellularisation, qui voit la formation des membranes cellulaires autour des noyaux du blastoderme syncytial. En résulte un tissu épithélial uniforme et continu juste sous la surface de la membrane extérieure de l'œuf (paroi vitéline). À partir de là, deux évènements morphogénétiques se produisent :

- **L'invagination du mésoderme.** Au cours de cette étape, les cellules ventrales de l'embryon formant le mésoderme vont former par invagination le canal ventral (*ventral furrow*). Le tout se déroule en deux étapes. En premier lieu, la surface apicale des cellules se réduit de manière aléatoire pendant les cellules s'allongent suivant l'axe apico-basal. On observe alors un aplatissement (**figure (4) (B)**) du tissu ventral puis sa courbure (**figure (4) (C)**). Ensuite, une bandelette antéro-postérieure d'une douzaine de cellules de large se contracte de manière coordonnée tandis que leur surface basale s'accroît. Enfin le canal ventral est formé.
- **Élongation de la bandelette germinale (*GBE : germband extention*).** Une dizaine de minutes après le début de la gastrulation, on observe une élongation du tissu ventral composé des deux tiers arrière de l'embryon que l'on appelle bandelette germinale (*germband*). Pour doubler sa taille suivant l'axe antéro-postérieur, le tissu se rétrécit de moitié dans la direction dorso-ventrale. La bandelette germinale est, au départ, constituée de cellules hexagonales et, lors de l'élongation de tissu, on observe une réorganisation des cellules les unes par rapport aux autres (**figure 5 C**). Les cellules changent de voisines : les cellules en contact selon l'axe antéro-postérieur voient s'intercaler entre elles la voisine du dessus, *i.e* les voisines dorso-ventrales deviennent des voisines antéro-postérieures. Ce phénomène est appelé "intercalation" et est illustré très clairement en **figure 6**. L'intercalation a pour origine la réduction en longueur jusqu'à disparition des jonctions parallèles à l'axe dorso-ventral (souvent appelées jonctions verticales par abus de langage), suivie de la création d'une nouvelle jonction orientée selon l'axe antéro-postérieur.

0.2 Mécanique des jonctions cellulaires

Les mécanismes intracellulaires qui sous-tendent les évènements morphogénétiques présentés au chapitre précédent sont liés à la dynamique du cytosquelette au niveau des surfaces apicales des cellules. Les forces responsables des constriction apicales (invagination du mésoderme) ou des réarrangements topologiques (élongation de la bandelette germinale) sont toutes transmises par les jonctions adhérentes qui relient les cellules entre elles par un assemblage complexe de protéines du cytosquelette (actin, myosine II, et autres protéines liant ces composants entre eux).

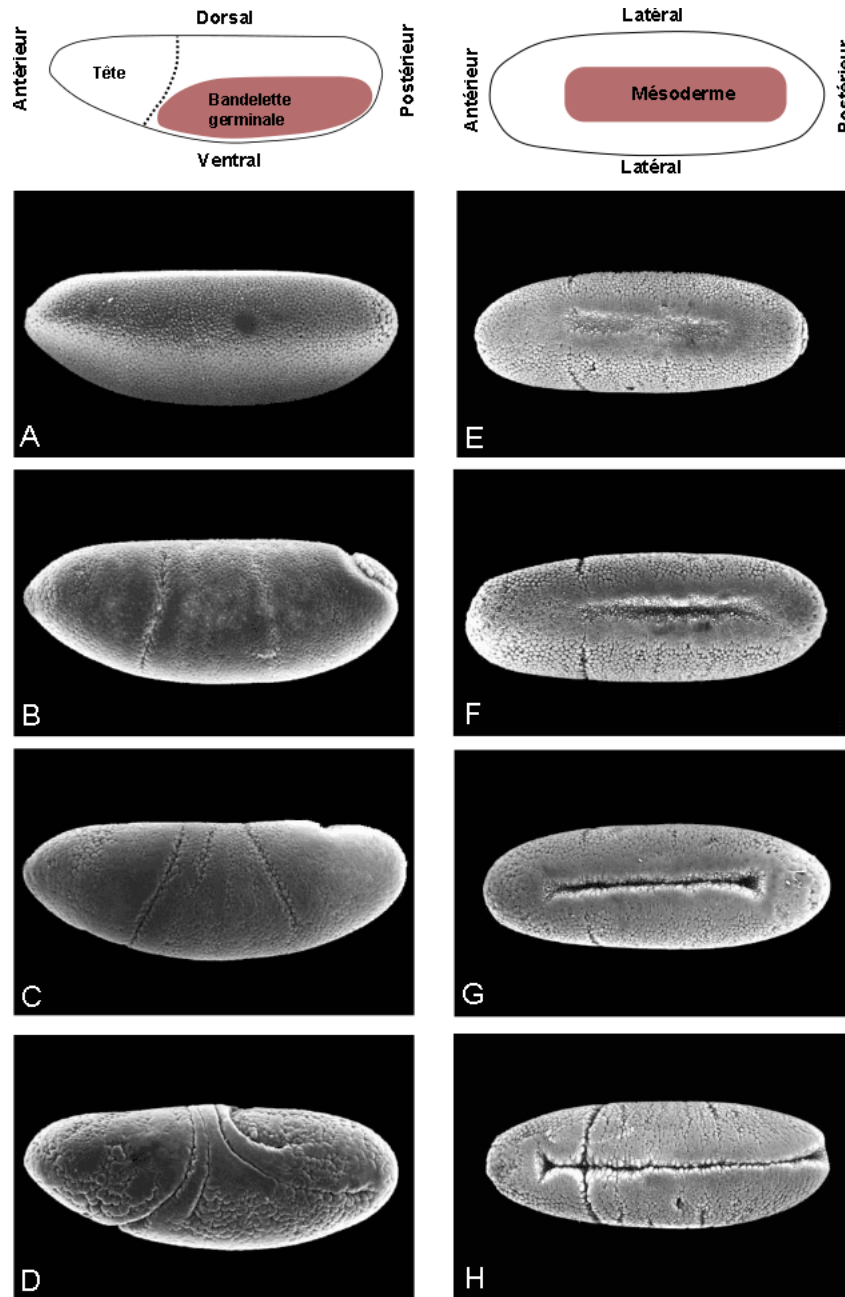


FIGURE 3 – Embryon de drosophile au cours de la gastrulation, images par microscopie électronique à balayage. (A-D) Élongation de la bandelette germinale. (E-H) Invagination du mésoderme. Images adaptées de (TURNER et MAHOWALD 1977)

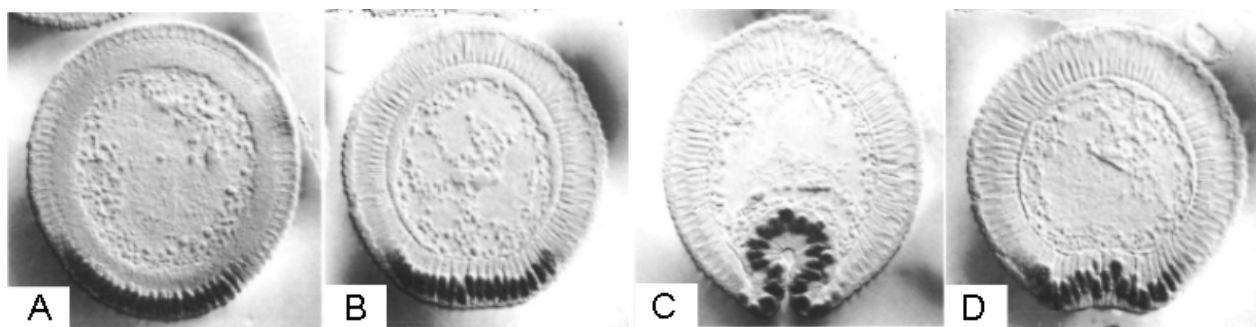


FIGURE 4 – (A) Vue sagittale d'un embryon sauvage de drosophile dont les cellules du mésoderme sont marquées avec un anticorps anti-Twist (protéine présente dans les cellules du mésoderme). Vue avant l'invagination (A). Le mésoderme s'aplatit (B), se courbe (C) puis s'invagine (D). Image adaptée de (LEPTIN et GRUNEWALD 1990).

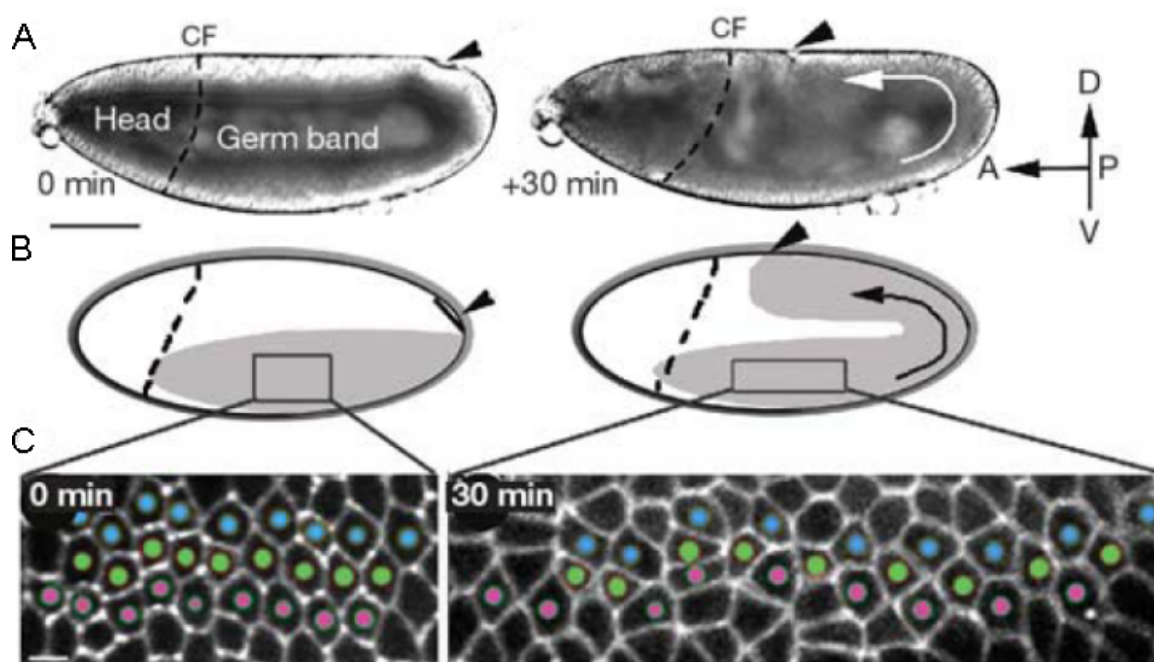


FIGURE 5 – Élongation de la bandelette germinale. **A** Images d'embryons avant et après. **B** Représentation schématique des embryons en **A**. **C** Images con-focale de la bandelette germinale avant et après extension. Adaptée de (BERTET, SULAK et LECUIT 2004).

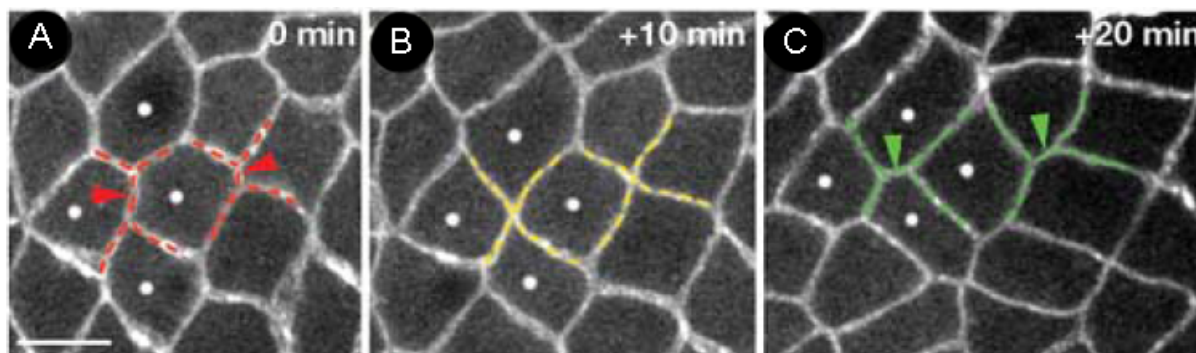


FIGURE 6 – **A** Réduction des jonctions verticales. **B** Transition T1 où quatre cellules sont en contact. **C** Formation des nouvelles jonctions horizontales. Adaptée de (BERTET, SULAK et LECUIT 2004).

0.2.1 Origine moléculaire des forces

Les forces responsables des évènements morphogénétiques décrits plus haut émergent du réseau protéique appelé cytosquelette. L'ensemble des protéines le composant peuvent être classifiées en trois ensembles distincts :

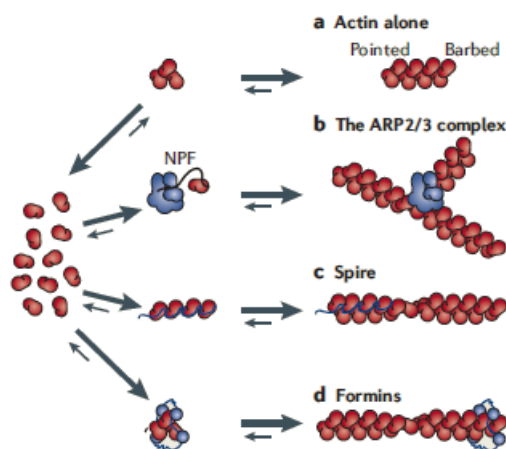


FIGURE 7 – Différents modes de polymérisation de l'actine en filament. Adaptée de (GOLEY et WELCH 2006).

Les filaments du cytosquelette.

Il existe trois types de filaments formant le cytosquelette : les filaments d'actines, les filaments intermédiaires, et les microtubules. Leur rôle et leur localisation dans la cellule sont très différents les uns des autres. Ils partagent la caractéristique d'être composés d'un ensemble de sous-unités identiques : monomères d'actine globulaires (*G-Actin*) pour les filaments d'actines (*F-actine*), dimères de tubuline pour les microtubules, et monomères de kératine pour les filaments intermédiaires. La construction d'un filament se déroule

donc par l'addition de nouveaux monomères aux filaments préexistants. Pour assurer la dynamique cellulaire, les filaments du cytosquelette sont capables de polymériser et dépolymériser d'une manière dépendante de l'ATP.

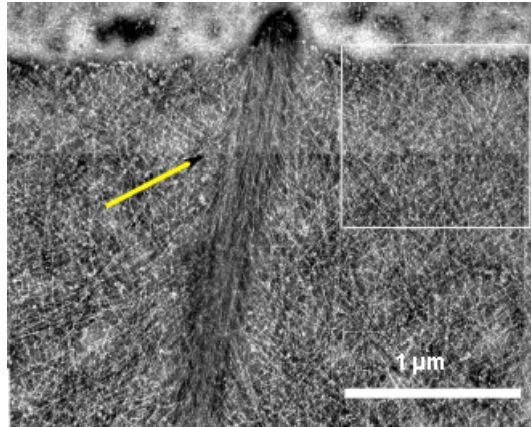


FIGURE 8 – Image en microscopie électronique à balayage du front de migration d'une cellule. La flèche jaune désigne un filopode (faisceaux de filament d'actines) émergeant du lamelipode (réseau d'actine branchée. Adaptée de (KOESTLER et al. 2008).

L'actine forme des filaments hélicoïdaux (**figure (7)**), dont la nucléation peut être soit naturelle, soit déclenchée par d'autres protéines. Deux protéines sont particulièrement intéressantes, car impliquées dans la migration cellulaire. La molécule ARP2/3 s'attache à un filament d'actine et promeut la croissance d'un deuxième filament à un angle d'environ 70 degrés. Les réseaux polymérisés par ARP2/3 sont dits "branchés" et sont, entre autres, à l'origine des forces protusives en jeu lors de la migration cellulaire : formation du lamelipode. À l'opposé du réseau branché, les formines promeuvent le développement de faisceaux de filaments d'actines responsables des filopodes.

Moteur moléculaire, myosine II

La Myosine II (non musculaire) est un moteur moléculaire agissant dans le cytosquelette. Par ceci, on entend que la protéine peut générer des forces de manière répétée dans le temps, au contraire des filaments d'actine qui n'exercent de forces qu'à travers sa polymérisation. La protéine de Myosine II est un hexamère composé de deux chaînes lourdes (*heavy chain*), de deux chaînes légères dites essentielles, et, enfin, de deux autres chaînes légères dites régulatrices. Les chaînes lourdes sont composées d'une tête globulaire où se trouve le site de liaison à l'actine et le site d'hydrolyse de l'ATP. Ensuite, on trouve le domaine du cou, sur lequel les chaînes légères essentielles et régulatrices se lient. Enfin, se trouve la queue en hélice alpha qui permet aux deux trimères (chaîne lourde plus les deux chaînes légères) de s'associer pour donner la structure bicéphale représentée en **figure (9) (A)**. Les chaînes légères dites régulatrices ont pour fonction de réguler l'activité du domaine moteur par sa phosphorylation ainsi que l'association en mini-filaments.

Les chaînes légères dites essentielles servent de lien entre les chaînes lourdes et régulatrices.

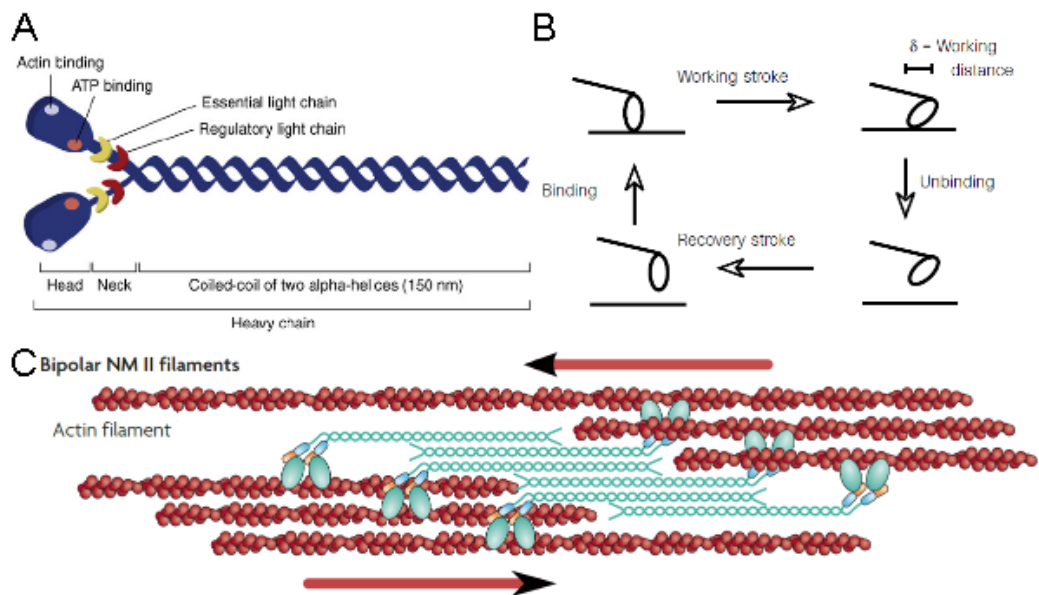


FIGURE 9 – **A** Structure de l'héxamère de myosine II, adaptée de (QUINTIN, GALLY et LABOUESSE 2008). **B** Cycle d'hydrolyse de la myosine II, adaptée de (HOWARD 1997). **C** Mini-filaments de myosine II tirant sur des faisceaux d'actine, les flèches rouges indiquant la direction de chacun d'eux. Adaptée de (KOESTLER et al. 2008).

La myosine II produit une force via l'hydrolyse de l'ATP. Son application suit le processus schématisé en **figure (9) (B)**. La tête de la myosine est attachée à un filament d'actine; la fixation d'un ATP entraîne, via son hydrolyse, une contraction de la tête (*power stroke*). La tête liée à l'ADP se détache du filament, et éventuellement l'ADP est évacué, permettant à la tête de se rattacher au filament. Un nouveau cycle peut alors commencer.

Ainsi configuré, l'héxamère de myosine II peut ainsi traîner un cargo (vésicule ou autre) le long d'un filament d'actine. En revanche, quand plusieurs protéines de Myosine II s'assemblent en mini-filaments (**figure (9) (C)**), on obtient une structure capable de faire glisser deux filaments d'actines (ou deux faisceaux) dans des directions opposées. Dans certaines conditions *in vitro* où seules l'actine et la myosine sont présentes, il a été montré que l'activité de la myosine II rendait le réseau plus fluide^{1 2} puisque le glissement des filaments d'actine diminue sa viscosité apparente. Dans d'autres conditions, notamment quand les filaments d'actines sont liés à d'autres éléments, les mini-filaments de myosine ont tendance à tendre le réseau puisqu'ils appliquent des forces contraires.

1. HUMPHREY et al. 2002.

2. LE GOFF, AMBLARD et FURST 2001.

Protéines de liaison (*cross linkers*).

Là où l'actine et la myosine constituent les principaux éléments du cytosquelette, un grand nombre de protéines relie mécaniquement et de différentes manières le réseau d'acto-myosin. Ces protéines, que l'on nomme *cross-linkers* par manque de terme appropriés/satisfaisants en français, modifient drastiquement les propriétés mécaniques et le comportement du cytosquelette. Nous avons déjà parlé de quelques comportements observés induits par la myosine II, seul *cross-linker* actif. Mais si on rajoute de la filamine à un mélange d'acto-myosine, on observe l'effet inverse : bien que souple et de relativement grande taille, les protéines de filamine, en créant des ponts entre les filaments d'actine, vont les empêcher de glisser, et les forces exercées par les mini-filaments d'actine ont pour effet de raidir le réseau de plus de deux ordres de grandeur³.

Un autre exemple est celui des *cross-linkers* fascine qui, de petite taille, relie fortement deux filaments d'actine parallèles. En association avec la protéine de nucléation formine, on observe l'apparition de faisceaux d'actine très rigides qui forment les filopodes.

Les *cross-linkers* ont aussi pour effet de modifier profondément la réponse mécanique du cytosquelette. Ainsi, un réseau constitué d'actine et de filamine a un comportement élastique linéaire doux (1Pa). Si la tension appliquée est forte, le réseau n'a plus assez de possibilités pour accommoder ce surplus de stress, et on observe une augmentation non-linéaire de l'élasticité de plus de trois ordres de grandeurs⁴. Ce phénomène pourrait être déclenché/préparé par les myosines II naturellement dans une cellule, on parle alors de système pré-stressé.

Les cellules possèdent donc tout un éventail de possibilités pour s'adapter mécaniquement à leur environnement et possiblement le modifier.

0.2.2 Mécanique des jonctions cellulaires

Comme on l'a vu précédemment, les cellules composant un épithélium sont reliées fermement par des associations de protéines trans-membranaires. La plus célèbre d'entre elles, ou tout du moins la plus étudiée en raison de l'importance de son rôle lors d'événements morphogénétiques, est la E-cadhérine (principale protéine impliquée dans les jonctions adhérentes entre cellules). Les liaisons cadhérine sont homophiliques *i.e* : adhésion de deux domaines extra-cellulaires identiques. La cadhérine est aussi connue pour former des clusters^{5 6 7}. Ces clusters servent de points d'ancrage au cytosquelette,

3. KOENDERINK et al. 2009.

4. GARDEL et al. 2004.

5. CAVEY et al. 2008.

6. MULLER et WIESCHAUS 1996.

7. TEPASS et HARTENSTEIN 1994.

permettant ainsi aux forces générées par celui-ci d'agir sur la forme de la cellule ou de la transmettre aux autres cellules du tissu.

Le lien entre le cytosquelette et les points d'ancrage est assuré par les protéines β -caténine qui se lient à l'E-cadhérine auxquelles viennent se lier les protéines α -caténine, elles-mêmes liées à l'actine. L' α -caténine est une protéine essentielle dans la transmission des forces et donc pour le remodelage des cellules. Il a été rapporté que, sous tension, l' α -caténine pourrait se déplier et révéler un site, autrement caché, de liaison avec la vinculine⁸. Ce phénomène pourrait permettre le déclenchement d'une chaîne de réactions biochimiques par le biais d'une force. Il a été suggéré que ce mécanisme induirait le renforcement mécanique du point d'ancrage.

0.3 Objectifs

L'organisation des contacts cellulaires dans un tissu dépend de l'organisation des molécules d'adhésion, en particulier la E-cadhérine, et du réseau cortical d'acto-myosine sous jacent aux interfaces cellulaires. La tension aux jonctions cellulaires résulte de la contractilité du réseau produite par la Myosine-II, de sa composition, de son organisation et de son ancrage aux interfaces via les complexes d'adhésion. L'objectif de mon travail de thèse est de mettre en place des méthodes pour sonder directement les tensions mécaniques et certaines propriétés mécaniques (raideur, viscosité) et pour comprendre à terme comment la composition, l'organisation et l'ancrage du cortex contrôlent ces grandeurs mécaniques. De plus, à l'échelle du tissu, le réseau de jonctions est susceptible de transmettre des 'informations' mécaniques et de coupler des déformations se produisant dans une certaine région à d'autres régions. Cette propriété tissulaire est importante pour comprendre l'impact global d'une déformation locale sur le changement de forme d'un tissu et sur les interactions mécaniques possibles entre tissus. Caractériser cette propriété est aussi un objectif de mon travail. Pour atteindre ces objectifs, j'ai choisi une approche expérimentale qui combine des manipulations mécaniques locales à l'imagerie globale d'un tissu *in vivo*.

8. YONEMURA et al. 2010.

Deuxième partie

Méthodologie

Chapitre 1

Méthodologies et approches existantes

Objectifs

L'étude de la mécanique du vivant est un champ scientifique récent, qui a nécessité le développement et l'adaptation de méthodologies existantes aux contraintes des différents échantillons : solutions de protéines purifiées, cellules, agrégats cellulaires, épithéliums de culture et, plus récemment, organismes vivants. Dans ce chapitre, je présenterai les principales techniques et approches employées, leurs principes, leurs champs d'application et les contraintes associées.

1.1 Méthodologies quantitatives

1.1.1 Par contact direct.

Aux échelles cellulaires, plusieurs difficultés s'opposent aux mesures mécaniques. La plus évidente d'entre elles est la taille de l'échantillon. En effet, une mesure mécanique est généralement réalisée en appliquant sur l'échantillon une contrainte/force donnée et en observant la réponse de l'échantillon. La sonde utilisée est souvent un objet micrométrique qui peut être manipulé. En microscopie à force atomique, une bille est attachée à la pointe du micro-levier et permet ainsi l'application d'une force sur la cellule^{1 2 3}. Le comportement mécanique d'une cellule ainsi déformée dépend du cytosquelette sous-jacent, permettant de sonder directement sa mécanique locale. Les expériences réalisées sur vésicules lipidiques montrent que la contribution mécanique de la membrane cellulaire est négligeable par rapport à celle du cytosquelette.

1. RADMACHER et al. 1996.

2. KRIEG et al. 2008.

3. DIMITRIADIS et al. 2002.

Une autre manière d'envisager une mesure mécanique consiste à mettre l'échantillon sous presse : une plaque applique une pression homogène sur tout l'échantillon, tandis que l'autre, rigide, fait office d'enclume. Cette approche a été mise en œuvre avec succès aux échelles cellulaires, grâce à l'utilisation de fines lamelles de verre dont la rigidité est connue et qu'on peut déplacer précisément au moyen de céramiques piézo-électriques^{4 5}. La cellule ou l'échantillon (agrégat cellulaire et autre) étant entièrement placés dans la presse, les mesures obtenues renseignent sur la mécanique globale de l'échantillon.

La matière biologique a une réponse mécanique distincte de celle de la matière inerte en cela qu'elle peut elle-même générer des forces et modifier et adapter sa mécanique au cours du temps ; le matériau est dit actif. Il est également courant qu'une cellule présente une activité différente selon l'endroit où on la sonde. On peut donc avoir besoin de méthodes permettant d'établir une cartographie mécanique de l'échantillon. Par exemple, lors des phénomènes de migration, on s'attend à une spatialisation des propriétés mécaniques ainsi que de l'activité cellulaire. Dans ce contexte, les méthodes de microscopie de traction de forces (Traction force microscopy : TFM) ont été développées afin de pouvoir cartographier les forces qu'exercent une cellule ou un tissu sur le substrat. Le principe est simple, la rigidité du substrat est connue et constante, et si on peut mesurer sa déformation locale, on peut en déduire la force qui s'y applique. Deux approches permettent l'imagerie et donc la mesure des déformations locales du substrat : soit le substrat est un gel continu dans lequel des billes fluorescentes sont incluses⁶, soit le substrat est composé de piliers (planche de fakir) dont on image les déformations⁷.

Ces méthodes permettent de réaliser des mesures de forces ou de propriétés mécaniques locales (AFM, TFM) pouvant donner lieu à une cartographie ou de manière globale (micro-lamelles). Mais toutes partagent la caractéristique d'être extérieures à l'échantillon et en contact mécanique avec sa surface. C'est donc une limitation pour les mesures intracellulaires. Dans les cas où les propriétés mécaniques internes à l'échantillon sont étudiées, les méthodes précédemment présentées ne sont plus adaptées. Il faut alors faire appel à des approches sans contact direct permettant l'accès aux mécaniques intracellulaires, i.e à l'intérieur de l'échantillon. Ces méthodes dites indirectes étant plus à même d'être utilisées au sein d'un organisme vivant, j'en fais une présentation plus détaillée.

1.1.2 Méthodes intracellulaires passives

On peut déduire des mouvements browniens d'une particule (sonde) incluse dans un milieu les propriétés mécaniques de son environnement. Cette approche présente l'avan-

4. FOTY et al. 1994.

5. DESPRAT, GUIROY et ASNACIOS 2006.

6. HARRIS, WILD et STOPAK 1980.

7. DELANOË-AYARI, RIEU et SANO 2010.

tage de ne pas nécessiter l'application d'une force à l'échantillon. À partir d'une série d'images, on peut suivre de nombreuses particules et ainsi réaliser autant de mesures qu'il y a de sondes. Cette méthodologie se prête donc particulièrement bien aux mesures internes de milieu hétérogène tel que la matière biologique.

Micro-rhéologie passive à une sonde

C'est la dénomination de l'application directe du principe de microrhéologie passive : la mécanique locale est mesurée à partir de la trajectoire brownienne d'une sonde. Cette technique ayant été couramment utilisée dans le cadre de ma thèse, ses principes et les détails de sa mise en œuvre sont présentés dans la section dédiée (3.2) de ce manuscrit.

Micro-rhéologie passive à deux sondes

Les mesures faites sur des trajectoires uniques (une particule) le sont sous l'hypothèse d'un milieu continu et homogène sans frontière à l'échelle de la sonde.⁸ Il a aussi été rapporté que de faibles interactions entre la sonde et le milieu fausseraient les mesures⁹. Pour palier ces défauts Crocker *et al*¹⁰ développèrent un cadre d'analyse où les propriétés mécaniques sont déduites des corrélations de mouvement entre deux particules incluses dans l'échantillon. Les résultats obtenus décrivent alors la mécanique du milieu séparant le couple de particules. Dénommée micro-rhéologie à deux points (TPM : Two-Point Microrheology) elle permet de s'affranchir des hétérogénéités locales du milieu, ainsi que des possibles interactions chimiques de celui-ci avec les sondes. Par contre, elle nécessite un grand nombre (une centaine) de particules suivies pendant environ 10 minutes, donnant lieu (à des million d'image), ce qui rend son application dans notre contexte (élongation de la bandelette germinale) difficile en raison de la dérive du tissu(cf 4.4).

1.1.3 Méthodes actives sans contact mécanique.

Ces méthodes fonctionnent sur le même principe que les méthodes de mesure quantitative présentées en début de section, à cela près que la force que l'on applique sur la sonde n'utilise pas de contact mécanique, rendant possible la manipulation de sondes au sein de l'échantillon et pas seulement en surface. Deux techniques sont utilisées pour manipuler des particules à distance : les pinces magnétiques et les pinces optiques. En tant que méthode potentiellement adaptable/utilisable dans l'embryon de drosophile, elles sont décrites en détails dans les sections dédiés (2.1) et (3.3).

8. CROCKER, VALENTINE *et al.* 2000.

9. VALENTINE *et al.* 2004.

10. CROCKER, VALENTINE *et al.* 2000.

1.2 Approches in vivo

De nombreuses mesures quantitatives ont été réalisées sur cellules, épithéliums, agrégats, et systèmes in vitro, mais une seule à ce jour fournit des mesures quantitatives in vivo¹¹. Mais si, actuellement, la majorité des méthodes quantitatives ne sont pas applicables/utilisées in vivo, d'autres approches expérimentales ont été développées pour étudier les mécaniques en jeu dans un organisme.

1.2.1 Ablation laser

Ablation locale

Comme expliqué plus en détail en 3.2.1, un tissu peut être considéré comme un ensemble mécanique en équilibre quasi-statique. Toute perturbation va ainsi entraîner un rééquilibrage dont l'observation est riche en informations qualitatives. À cet effet, Rauzi *et al* ont développé un système de nano-ablation laser (laser pulsé femtoseconde) avec lequel ils ont pu détruire les liaisons mécaniques entre deux cellules¹² (cytosquelette) sans pour autant créer de trou entre les deux cellules. Suite à l'ablation, ils ont pu observer le déplacement des vertex associés. La mesure de la vitesse de relaxation de ces-dernières dépend alors à la fois de la tension emmagasinée dans la jonction et des frictions du milieu qui s'y opposent. En comparant les vitesses de relaxation, si le milieu est mécaniquement homogène, elle nous renseigne sur cette tension. Ils ont ainsi pu montrer que durant l'élongation de la bandelette germinale, les jonctions dorso-ventrales, présentant un enrichissement en moteur moléculaire myosine II, étaient plus tendues (relaxation plus rapide) que les jonctions antéro-postérieures.

Ablation d'un tissu

En généralisant le principe de la nano-ablation laser à l'échelle d'un tissu¹³, on peut étudier le tenseur de tensions et de déformations qui s'exercent sur le tissu ou qu'il génère. Ainsi, si on sépare mécaniquement un disque de cellules, l'observation de la dynamique de rétraction et de changement de forme dudit tissu permet la déduction dans les deux directions du plan d'imagerie des tensions qu'il génère ou subit. De cette manière, Bonnet *et al* ont mesuré l'évolution de contraintes présentes au sein du thorax de drosophile lors de son développement.

11. DANIELS, MASI et WIRTZ 2006.

12. RAUZI, VERANT et al. 2008.

13. BONNET et al. 2012.

Limite de la nano-ablation

Malheureusement ce type d'approche ne peut qu'être qualitative tant que l'on ignore les propriétés mécaniques du milieu. La seule mesure qu'elle permet est celle d'une vitesse de relaxation. Or cette expérience est très similaire à la relaxation d'un ressort immergé dans un liquide. Pour un ressort identique emmagasinant la même tension, le temps de relaxation sera plus court pour une immersion dans de l'eau que dans du glycérol plus visqueux. Et la viscosité intracellulaire est à ce jour inconnue, de même que son homogénéité spatiale. Pour un milieu homogène, ces vitesses peuvent être comparées entre elles, mais tant que la friction opposée à la rétraction est inconnue, la tension ne peut être quantifiée.

Pour conclure, cette approche permet au mieux de comparer qualitativement les tensions le long des jonctions, ou plus globalement à l'échelle d'un tissu tant que l'hypothèse du milieu homogène est valable. Or dans le cadre de l'élongation de la bandelette germinale on sait que la composition du cytosquelette est anisotrope et de nombreuses études in-vitro indiquent une forte dépendance entre les propriétés mécaniques du cytosquelette et sa composition¹⁴.

1.2.2 Méthodes d'inférences.

D'autres approches non-invasives permettant d'établir une cartographie des tensions et des contraintes des jonctions ont été développées. Toutes ces méthodes font l'hypothèse d'un modèle mécanique précis, et infèrent leurs mesures à partir des changements de formes des cellules. Différents modèles mécaniques d'inférence ont été proposés. Une étude comparative de ceux-ci a récemment été publiée¹⁵.

Bien que séduisantes, on peut reprocher à ces méthodes de faire l'hypothèse consistant à séparer la cellule en deux éléments mécaniques distincts : le cortex à travers lequel les tensions sont produites et se propagent, et le cytosol homogène et visqueux qui s'oppose à la déformation de la cellule. Afin de mener à bien ce genre d'analyse, la viscosité du cytosol doit donc être quantifiée. Par exemple, les études menées par Brodland *et al*¹⁶ utilisent des valeurs de viscosités comprises entre $4.3 \cdot 10^{-3}$ Pa.s et 10^5 Pa.s.

14. KOENDERINK et al. 2009.

15. ISHIHARA et al. 2013.

16. BRODLAND et al. 2010.

Chapitre 2

Mesures micro-rhéologiques in-vivo

Objectifs

Le but de ce travail est de réaliser des mesures quantitatives de la mécanique intracellulaire au cours de la morphogénèse tissulaire dans l'embryon de *Drosophile*. Les méthodes directes qui consisteraient à manipuler les cellules à l'aide de pipettes ou de pointes ne sont pas envisageables puisque les cellules ne sont pas directement accessibles. Il nous faut donc avoir recours à des méthodes de manipulation et d'observation à distance telles que les techniques de microrhéologie. L'embryon de *drosophile* possède toutefois certaines spécificités qui nous ont conduits à adapter les techniques existantes, en particulier pour l'observation.

Certaines méthodes ont du être exclues au profit d'autres méthodes et je m'efforcerais dans ce chapitre d'expliquer les raisons de ces choix.

2.1 Utilisation d'une pince magnétique ?

L'embryon de *Drosophile* est un ovoïde de 500 μm de longueur, de 200 μm de largeur et de volume 6 nL. En raison de sa taille, il est important de savoir s'il est possible d'appliquer une force magnétique suffisante sur des billes de taille sub-cellulaire. La force magnétique est proportionnelle au gradient du champ présent ¹ :

$$F_B = m_b \times \delta B \quad (2.1)$$

où F_B est la force exercée par le gradient de champ magnétique δB sur une bille ayant un moment magnétique m_b . Or le gradient diminue avec la distance bille-pointe et avec le rayon de la pointe (de forme parabolique) (2.1) :

$$\delta B(r) = \frac{4\mu_0 M_m \beta}{(4\beta r + 1)^2} \quad (2.2)$$

où r est la distance entre la bille et la pointe, μ_0 est la perméabilité du vide, M_m la

1. DE VRIES et al. 2005.

magnétisation de la pointe et β définit le rayon de la pointe parabolique.

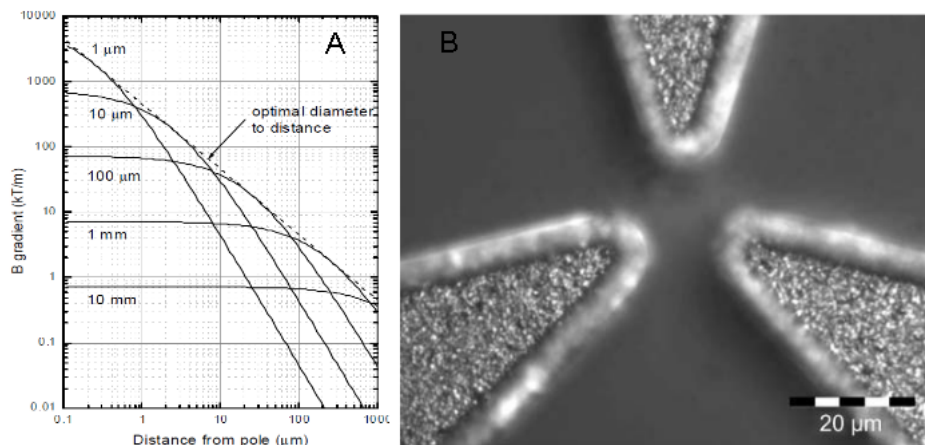


FIGURE 2.1 – (A) Evolution de gradient de flux magnétique en fonction de la distance à une pointe magnétique parabolique pour différents diamètres. (B) Image de pointes magnétiques paraboliques en cobalt. Figure adaptée de De Vries & al³

C'est à partir de ces formules que De Vrie & al⁴ ont construit une pince magnétique capable d'exercer des forces allant de quelques pN à 1 nN sur une bille de $2,7 \mu m$ de diamètre. Comme on peut le voir sur l'image B de la figure 2.1 de la pince, l'espace disponible pour l'échantillon mesure $15 \mu m$ de diamètre, ce qui est trop petit pour un embryon.

Si on devait construire une pince magnétique pour réaliser des mesures mécaniques intracellulaires dans l'embryon de drosophile, les pointes devraient être distantes du centre de l'embryon d'au minimum $100 \mu m$ (demi-largeur de l'embryon). Aussi, les pointes devraient avoir un rayon d'environ 1 mm pour atteindre d'après l'équation (2.2) un gradient maximal théorique d'environ $4.10^3 T.m^{-1}$ (ligne en pointillés sur la figure 2.1 (A)). Maintenant si on tient compte du facteur de réduction entre gradient théorique et expérimental, qui est de 4 ainsi que rapporté par De Vrie & al⁵, on obtient un gradient d'environ $1.10^3 T.m^{-1}$, donnant lieu à une force de 132pN pour une bille de moment magnétique $1,3.10^3 A.m^2$ (diamètre $2,8 \mu m$).

La taille de la bille soulève aussi un problème. En effet, durant l'extension de la bandelette germinale, les cellules mesurent en moyenne $5 \mu m$ de diamètre. Mesurer la mécanique intracellulaire nécessite donc des sondes (billes) plus petites ($R < \mu m$). Or le moment magnétique d'une sonde dépend du matériau dont elle est composée et de son volume :

$$m_b = M_{sonde} \times V_{sonde} \quad (2.3)$$

4. DE VRIES et al. 2005.

5. DE VRIES et al. 2005.

où m_b est le moment magnétique de la sonde, M_{sonde} sa magnétisation volumique et V_{sonde} son volume. Ainsi on comprend que réduire le volume d'une sonde sphérique réduirait 'au cube' son moment magnétique et donc la force applicable par la pince magnétique. Il existe bien sûr des billes ayant une magnétisation volumique supérieure. Le tableau (2.2) montre les forces théoriques auxquelles seraient soumises les différentes billes magnétiques disponibles dans un gradient de champ de 1.10^3 T.m^{-1} .

Billes	Diamètre (μm)	Magnétisation vol (kA.m^{-1})	Force à 1 kT.m^{-1} (pN)
Dynal M280	2.8	11.5	132
Dynal M450	4.5	20.6	982
Dynal MyOne	1.05	28.4	17
Immunicon	0.5	800	52
Bangs	0.35	50.8	1.5
Bangs	0.3	50.8	0.7
Immunicon	0.15	800	1.4
100% fer	0.5	1700	112
100% fer	0.15	1700	3
100% fer	0.1	1700	0.9
100% fer	0.05	1700	0.1

FIGURE 2.2 – Tableau présentant les différentes billes magnétiques disponibles, ainsi que la force produite sur elles par un gradient magnétique. Adapté la de thèse de Vries.

On voit que ces pointes d'un millimètre de rayon permettraient de générer des forces allant jusqu'à 100 pN avec des microparticule de fer. Seulement, ce type de pointe ne permet de créer qu'un piège uni-directionnel, il est géométriquement impossible de placer plus de 2 pointes avec un tel rayon sur la circonférence d'un cercle de $200 \mu\text{m}$ de diamètre. D'autre part, les microparticules de fer ne sont pas fluorescentes et, elles ne peuvent pas être détectées dans un embryon de Drosophile. Notre choix s'est donc porté sur les pinces optiques qui présentent plusieurs avantages comme nous le verrons par la suite.

2.2 Imagerie microscopique de l'embryon

L'imagerie optique d'embryon de drosophile vivant se pratique de manière quotidienne dans tous les laboratoires utilisant ce-dernier comme modèle. L'embryon présente l'avantage d'être très simple à préparer et à manipuler.

2.2.1 Préparation de l'échantillon

Il n'est pas possible d'observer les cellules de l'embryon sans préparation préalable. L'œuf, tel qu'il est après la ponte, est protégé par deux membranes :

- le chorion, enveloppe rigide, rugueuse et opaque, protège l'embryon. Il comporte en outre deux filaments respiratoires, responsables des échanges gazeux.

- la membrane vitelline, souple et transparente. Elle recouvre la membrane plasmique de l'embryon. Il n'est à ma connaissance pas possible de réaliser d'observation d'un embryon vivant sans elle.

Le chorion étant trop opaque, il convient de l'enlever (déchoriation) pour pouvoir réaliser des observations microscopiques de l'embryon. Pour cela il suffit de tremper les embryons dans de la javel pure pendant une minute puis de rincer.

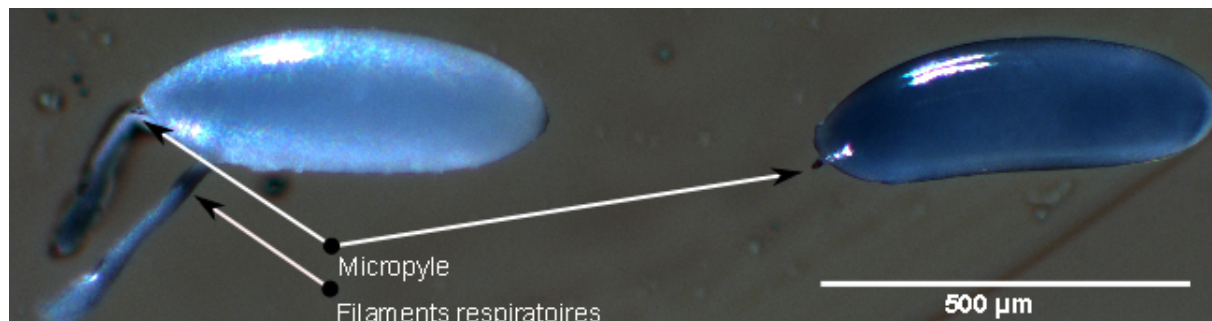


FIGURE 2.3 – Image d'un embryon de drosophile avec chorion, à gauche, et après déchoriation, à droite.

Maintenir un embryon vivant après déchoriation nécessite de le plonger dans un milieu perméable à l'oxygène et empêchant sa déshydratation/dessèchement. Différentes solutions peuvent être utilisées à cet effet :

- Une solution saline de type Ringer. Utiliser simplement de l'eau créerait en effet une différence osmotique dommageable à long terme à l'embryon, et ce malgré la membrane vitelline. L'eau s'évaporant rapidement, ces solutions sont à réserver à des observations de courtes durées ou à des portes échantillons adaptés (scellés ou de gros volume).
- Les huiles Halocarbone. Elles présentent de nombreux avantages pour l'observation avec un objectif non-immersif : elles sont perméables au gaz et ne s'évaporent pas. De plus, n'étant pas miscible avec l'eau, l'embryon ne peut pas se déshydrater. Ces huiles étant à l'origine prévues pour la mécanique, de très nombreuses viscosités sont disponibles : de 1 mPa.s à 2 Pa.s. Autre propriété physique d'intérêt : leur indice de réfraction varie avec la viscosité de 1.383 à 1.415.

2.2.2 Considérations opto-mécaniques

Une des premières questions que l'on se pose lorsque l'on cherche à regarder au microscope un nouvel échantillon est : "quel objectif peut être utilisé". L'objectif est la pièce maîtresse d'un microscope, au final c'est l'élément limitant la résolution finale et la quantité de lumière collectée. Et ce quelle que soit la méthode optique utilisée.

Heureusement, bien que trop gros pour les pinces magnétiques, l'embryon ne présente aucun obstacle mécanique à l'utilisation de quelque objectif que ce soit. On peut, en adaptant le porte-échantillon, imaginer l'embryon avec un objectif à immersion aussi bien

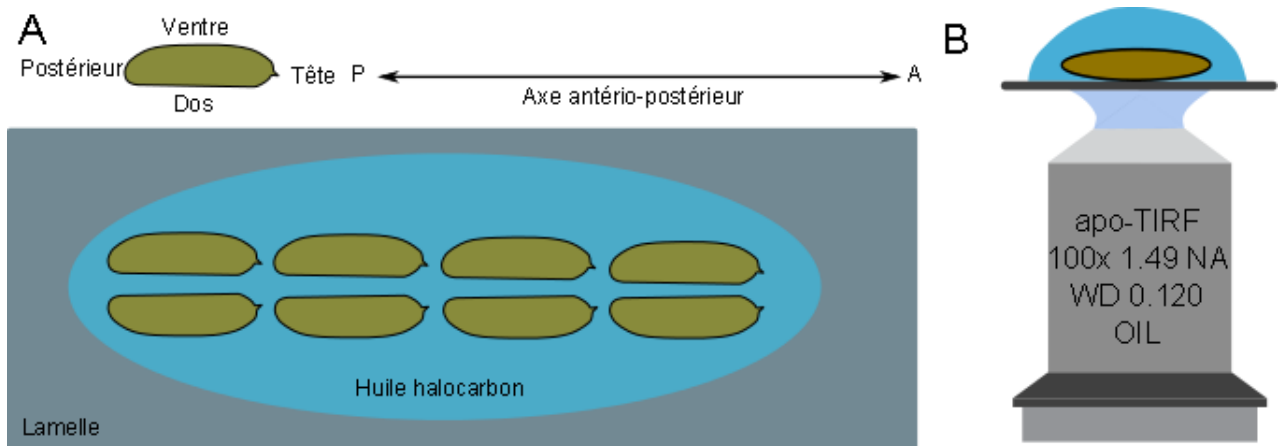


FIGURE 2.4 – Schéma de montage des embryons (A) Vue du dessus, (B) Vue par la tranche.

à eau qu'à huile. Il s'agit là des familles d'objectifs les plus contraignantes d'utilisation.

2.2.3 Contraintes optiques de l'embryon

L'embryon de drosophile est un des organismes multicellulaires les plus faciles à imager. Toutefois, de manière générale, toutes les méthodes optiques ne peuvent être utilisées. L'embryon est un œuf ; aussi il contient tout le matériel nécessaire (machinerie protéique, ARN, lipides...) au développement de l'organisme jusqu'au stade larvaire. Il est donc très opaque, surtout aux premiers stades du développement. Ceci est bien visible sur les image de la **figure (2.5 (A))**, où il est à peine possible de discerner les contours cellulaires en lumière blanche.

Nous avons donc affaire à un échantillon à la fois très absorbant et extrêmement diffusant, ce qui empêche l'utilisation de la lumière transmise. La lumière blanche, le DIC ou autre technique interférentielle sont donc inutilisables dans ce contexte. On pourrait également penser utiliser la microscopie en épi-fluorescence, mais là encore l'aspect extrêmement diffusant de l'échantillon pose problème. En effet, dans le cadre d'un marquage fluorescent homogène le long de l'axe optique, on observe (**2.5 (A)**) que l'image est saturée de photons émis dans d'autres plans que le plan focal. On préférera alors l'utilisation de méthodes à sectionnement optique telles que la microscopie confocale, à deux photons, ou les techniques d'illumination/excitation latérale (SPIM et ses dérivés). Par chance, notre principale protéine d'intérêt est la cadherine, qui elle-même est fortement enrichie le long d'une ceinture apicale (haut de la cellule) sur une épaisseur de $1\mu m$. Cela crée une sorte de sectionnement optique naturel puisque l'essentiel de la lumière de fluorescence provient de cette ceinture. Aussi, on peut réaliser des images exploitables en épi-fluorescence ou illumination oblique d'embryons marqués cadherine GFP.

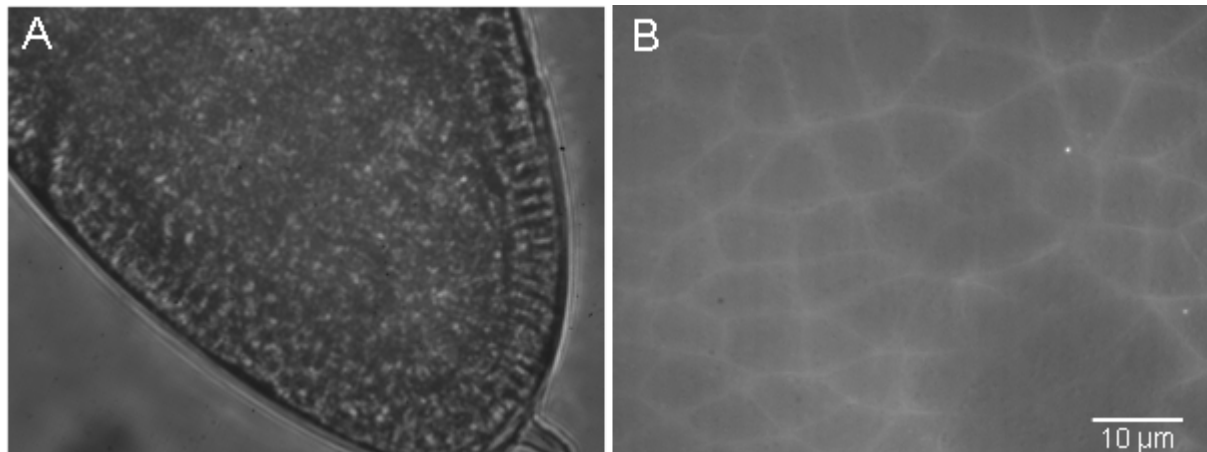


FIGURE 2.5 – Images d’un embryon de drosophile réalisé au 100x. (A) lumière blanche (B) imagerie de fluorescence de la protéine GAP43 : :GFP en excitation oblique.

2.2.4 Sondes mécaniques.

Toutes les techniques de micro-rhéologie ou de mesures de force indirecte nécessitent la présence au sein des cellules de sondes mécaniquement distinctes de l’échantillon et dont la mécanique et la forme sont connues.

Choix de la sonde.

Bien que, pour le suivi de particules ou la manipulation optique d’objets, il soit possible d’utiliser comme sondes les vésicules déjà présentes^{6,7}, rendant ainsi l’expérience la moins invasive possible, leur utilisation présente certains désavantages qu’il convient d’évaluer pour décider de leur possible utilisation in-vivo.

- **Interactions/rôles spécifiques indéterminés.** Les vésicules observées dans une cellule sont produites et transportées par la machinerie cellulaire et sont donc en interaction avec des protéines spécifiques. Quand certaines vésicules sont chargées d’apporter leur cargaison de protéines à la membrane plasmique ou au cortex, d’autres au contraire sont acheminées vers le noyau. Aussi, si on observe sans distinction toutes les vésicules visibles, leurs rôles et leurs interactions propres sont inconnues; les conditions de mesure sont donc mal connues. Si cette spécificité représente un avantage pour l’étude d’un type d’interaction ou de protéines telle que l’étude du moteur moléculaire dynein, elle peut introduire un biais dans le cadre d’une étude plus générale sur la mécanique de la cellule.

6. CROCKER et HOFFMAN 2007.

7. KUNWAR et al. 2011.

- **Problème de détection.** Dans l'embryon, la détection et le suivi des vésicules peuvent poser problème : la lumière blanche n'étant utilisable qu'à la périphérie du plan équatorial de l'embryon⁸, pour visualiser celle présente dans la bandelette germinale (i.e à travers tout l'embryon dans notre cas), deux options sont possible. Soit on marque les protéines transportées dans les vésicules par des fluorophores, soit on utilise la lumière diffusée émise par un autre fluorophore comme illumination homogène indirecte sous laquelle se détachent les vésicules par effet d'ombrage. Les deux cas présentent des contraintes. Pour les vésicules fluorescentes, comme il n'est pas possible de marquer tous les différentes protéines transportées, l'on se limite généralement à un seul type et seules certaines vésicules sont alors visibles. Pour la détection par ombrage, d'une part le contraste est faible et d'autre part, l'image des vésicules présente un côté sombre et un côté clair (figure 2.6 et n'est donc plus assimilable à une gaussienne, ce nécessite le développement d'un algorithme de détection spécifique à ce signal.
- **Variation de tailles et de formes.** Un paramètre clé des mesures mécaniques est la taille de la sonde. Le milieu étant en partie visqueux, la force de traînée subie par la sonde est directement proportionnelle à la taille de celle-ci (Eq.3.6). En effet, une imprécision de quelques pourcents sur la taille d'une particule se répercute, par propagation d'erreurs, en une imprécision d'une dizaine de pourcents sur la mesure de la viscosité du milieu. Or la majorité des vésicules ayant une taille inférieure à la limite de diffraction, il est très difficile de la mesurer précisément via l'image. D'autre part, même si au repos une vésicule a la forme d'une sphère en raison de la minimisation de son énergie de surface, in vivo, il est tout à fait possible que sa forme ne le soit plus qu'approximativement ; la vésicule n'étant pas rigide, elle peut en effet se déformer sous l'effet d'une traction ou être déformée par l'environnement (maille du cyto-squelette...). Or tous les modèles font l'hypothèse d'une sphère rigide ; on doit donc s'attendre à l'ajout d'une imprécision supplémentaire à la mesure.
- **Faible indice de réfraction.** Les vésicules étant principalement composées d'eau, leur indice optique est proche de celui de cette dernière, ce qui limite (3.3.1) la force d'une pince optique. De plus, l'indice optique dépendant principalement de ce que transporte la vésicule, on peut s'attendre à des variations de forces de piégeage⁹.

L'alternative aux vésicules consiste à introduire des microsphères dans la cellule. Les différents avantages qu'elles apportent sont : leur nature, composition et taille connues et préalablement mesurées après production. Les particules que l'on peut se procurer dans le commerce présente donc plusieurs avantages :

- **Tailles contrôlées.** La taille est mesurée et la variation de taille entre les billes est

8. KUNWAR et al. 2011.

9. SVOBODA et BLOCK 1994.

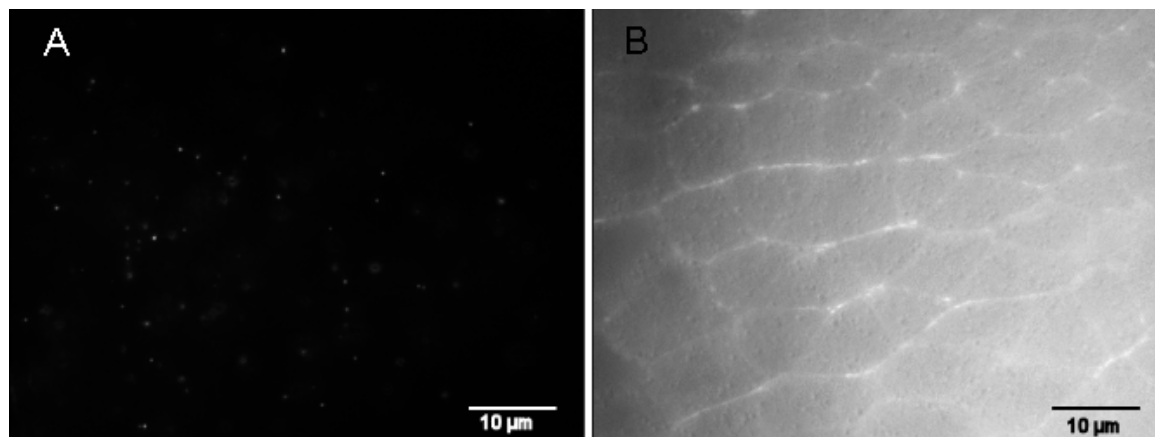


FIGURE 2.6 – (A) Image de bille de 100 nm de diamètre dans l’embryon de drosophile. (B) Image d’un embryon *sqh::GFP*, au sein des cellules, on peut distinguer les vésicules.

connue également. Une partie de l’incertitude de la mesure peut ainsi être prédite. Il est possible de trouver des billes de diamètre allant de 20 nm à plusieurs μm .

- **Sphères solides.** Les procédés de fabrication assure la sphéricité des particules¹⁰.
- **Matériaux connus.** On trouve des particules composées de silice, de latex ou de polystyrène. Tous ces matériaux présentent un indice optique bien supérieur à celui de l’eau de 1.47, 1.59 et 1.59 respectivement. Une force de piégeage optique (30-50 pN avec des *μsphères* de polystyrène de 500 nm de diamètre) supérieure à celle que l’on peut espérer atteindre avec une vésicule est ainsi assurée.
- **Chimie de surface connue et modifiable.** Les micro-sphères présentent l’avantage de permettre la modification de leurs propriétés de surface. Il est possible de se procurer des particules présentant différents revêtements chimiques (carboxyle, sulfate, amine...). Pour chaque surface, des protocoles permettant d’y lier différents types de protéines, polymères ou molécules, existent. Il est ainsi possible d’y lier de manière covalente des polymères de Poly-éthylène-glycol (PEG) afin de rendre les particules hydrophiles et neutres vis à vis de leur environnement¹¹. Au contraire, on peut aussi y fixer des anticorps offrant alors une interaction très spécifique entre les billes et la protéine cible¹².
- **Billes fluorescentes et/ou magnétiques.** Lors de la fabrication, il est possible d’intégrer à la matière des billes une grande quantité d’un ou plusieurs

10. SHIM et al. 1999.

11. VALENTINE et al. 2004.

12. VALENTINE et al. 2004.

fluorophores rendant ainsi les particules très brillantes et présentant un taux de photo-blanchiment très faible. Il découle de cette brillance un suivi de particule aisé et surtout très précis, la précision de pointé dépendant principalement du rapport signal sur bruit de la cible avec son environnement. Il est également possible de trouver des billes présentant des propriétés magnétiques. Si dans l'embryon de drosophile le piégeage magnétique présente peu d'avantages par rapport aux pinces optiques(cf section 2.1), on peut utiliser cette propriété pour attirer et/ou maintenir une population de particules dans une région précise de l'embryon au moyen d'un champ magnétique constant ¹³.

Méthodes d'injections.

Si les billes présentent certains avantages pour le suivi de particules (taille, brillance, spécificité ajustable) ainsi que pour le piégeage optique (taille, indice optique, monodispersité), elles requièrent toutefois un processus d'injection spécifique.

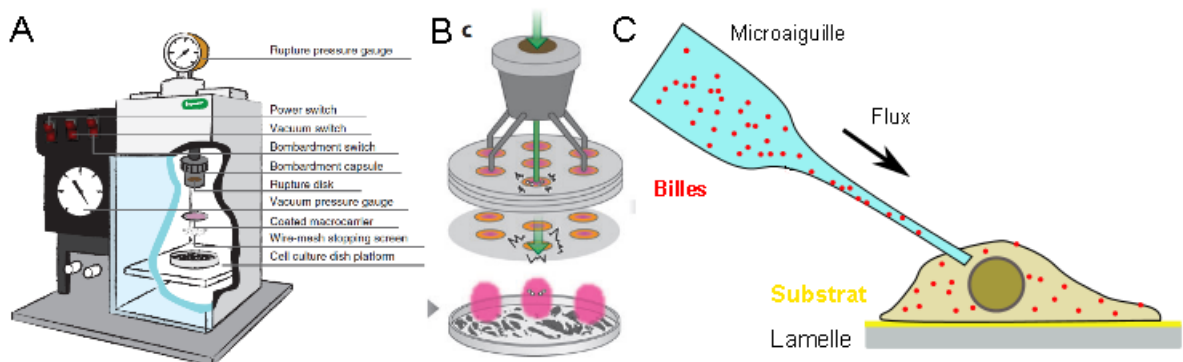


FIGURE 2.7 – (A)(B) Système de micro-injection balistique de particules. Image tirée de (WIRTZ 2009) et de (WU et al. 2012). (C) Injection de billes dans une cellule en culture.

Différentes techniques permettent de réaliser cette injection. Si l'échantillon est un phagocyte, l'internalisation est naturelle. Dans le cas contraire, on peut attacher à la surface de la bille des protéines/molécules déclenchant son endocytose par l'échantillon. Une conséquence de cette internalisation est que les billes se retrouvent revêtues d'une bi-couche lipidique supplémentaire. Dans les deux cas, la particule ainsi introduite est prise en charge par la machinerie d'endocytose, ce qui implique un acheminement actif des billes. Un autre type de stratégie consiste à injecter mécaniquement les billes dans la cellule, i.e à faire un trou dans la membrane plasmique. Pour cela, on peut soit utiliser une micro-aiguille et un micro injecteur, qui sont peu appropriés aux cellules de culture (taux de mortalité élevé et injection d'une cellule à la fois); soit avoir recours à la

13. MA et al. 2011.

technique dite de l'injection ballistique¹⁴ (BIN : ballistic injection nanorhéologie) qui consiste à projeter à grande vitesse les billes sur l'échantillon afin que celles-ci percent la membrane. Cette dernière méthode permet d'injecter une grande quantité de billes dans beaucoup de cellules à la fois et présente de plus un taux de mortalité proche de 0%¹⁵.

Le laboratoire ne possédant pas de BIN mais un micro-injecteur couramment utilisé pour l'embryon de drosophile (injection de drogue, de recombinant ou d'ARN interférent), nous avons tenté d'injecter dans l'embryon des billes fluorescentes rouges (molecular-probes : carboxylated-modified fluorosphere red) de tailles allant de 20nm à 2 μm présentant une surface carboxyle. L'injection est effectuée avant l'élongation de la bandelette germinale. Pour chaque taille, nous avons caractérisé la présence des billes dans le plan d'intérêt (ceinture apicale d'adhésion) après injection à différents stades de développement (tableau 2.8).

		Stade du développement					
		<5	5.1	5.2	5.3	5.4	>5
Φ billes (nm)	20	?	+	+++	+++	+	✗
	40	?	+	+++	+++	+	✗
	100	✗	+	++	+++	+	✗
	500	✗	sporadique	+	+++	sporadique	✗
	1000	✗	✗	✗	sporadique	✗	✗
	2000	✗	✗	✗	✗	✗	✗

FIGURE 2.8 – Présence de billes dans le plan des jonctions adhérentes.

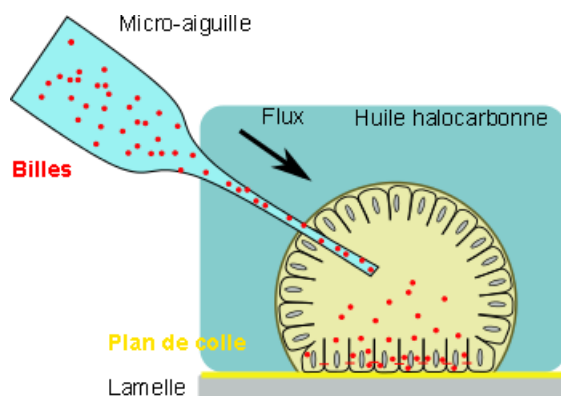


FIGURE 2.9 – Injection de particules dans un embryon de drosophile durant la cellularisation.

Le stade d'injection est un paramètre critique à l'internalisation des particules. En

14. LEE et al. 2006.

15. WU et al. 2012.

effet, c'est durant celui-ci que se forment les cellules. Avant, l'embryon est un syncytium, cellule contenant plusieurs noyaux (13 divisions nucléaires). Durant la cellularisation (figure 2.10), la membrane plasmique s'invagine et croît vers l'intérieur de l'embryon (introggression) autour de chacun des noyaux disposés sous la surface de l'embryon. Il est possible de distinguer deux phases de progression de la membrane (front de cellularisation), la première, lente durant laquelle le noyau s'allonge; une fois celui-ci dépassé, la progression s'accélère jusqu'à atteindre une longueur d'environ 20-25 μm . Enfin, le front de cellularisation (*furrow canal*) s'élargit horizontalement afin de refermer chaque cellule et devient la membrane basale.

On comprend alors que pour internaliser les micro-sphères qui ne sont pas naturellement internalisables par les cellules comme l'on a pu l'observer à la suite d'injections effectuées dans l'espace périvitelin (espace entre les membranes plasmiques et la membrane viteline), la cellularisation représente la meilleure opportunité. La phase rapide (étape 3 sur la figure 2.10) représente la phase la plus efficace. En effet, durant la phase lente, le cortex du *furrow canal* enserre le noyau, limitant ainsi l'espace disponible aux billes pour passer. Une fois la bonne longueur de membrane atteinte, les cellules commencent à se refermer et le réseau protéique qui en est le responsable gêne le passage des billes.

Quant à la taille des billes, elle s'avère critique dans deux régimes. Pour l'injection proprement dite, pour des tailles supérieures à 500nm, il arrive que les billes bloquent la micro-aiguille. J'ai donc du, pour éviter cela, modifier légèrement les paramètres usuels de fabrication par étirement (étireuse Sutter instrument micropipette puller model p-97) des micro-aiguilles, pour obtenir un diamètre interne de sortie légèrement plus large. Afin de limiter les dommages engendrés par la pénétration de l'aiguille, les aiguilles produites avec ces nouveaux paramètres permettent d'injecter efficacement des billes jusqu'à 500nm de diamètre. D'autre part, à ce stade, les cellules sont relativement étroites : 3-4 μm de diamètre, ce qui, à mon avis, est la principale cause de l'exclusion des billes supérieures à 500nm dans le cadre d'injections réalisées avec des tailles d'aiguilles appropriées.

Pour conclure, il est possible d'introduire des microsphères dans un embryon de drosophile par micro-injection. L'injection ayant lieu au centre de l'embryon, l'intégrité physique des cellules observées (collées à la lamelle) n'est donc pas affectée, autrement dit les dommages causés à l'embryon par l'injection ne se situent pas sur le tissu observé.

Interaction des sondes avec l'échantillon

Les billes injectées présentent une surface recouverte de groupement de carboxyle (COOH). D'après les spécifications du fabriquant, aucune interaction spécifique n'a été observée au sein de la cellule. Il est aussi rapporté que ce revêtement rend les billes chargées négativement et légèrement hydrophobes. Un certain nombre d'études de rhéologie ont été réalisées avec ces billes et l'incidence qu'a leur revêtement sur les

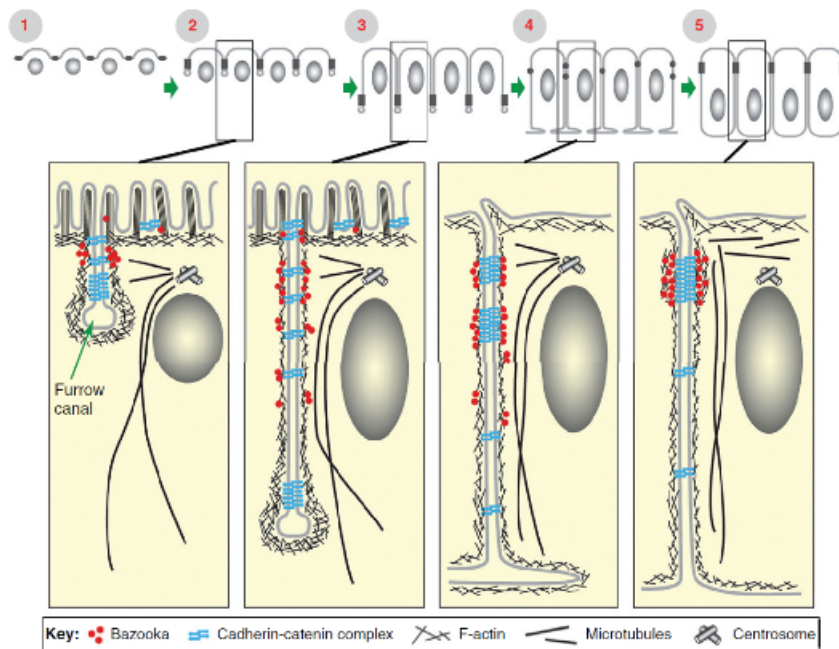


FIGURE 2.10 – Représentation schématique du processus de cellularisation, extraite de Laprise *et al* (LAPRISE et TEPASS 2011).

mesures semble être négligeable *in vitro*. En 2002, Tseng *et al*¹⁶ montrèrent qu'après incubation de 24h de billes carboxyle dans l'extrait cellulaire de cellules Swiss 3T3 lysées, seul l'équivalent massique d'un monomère d'actine serait en moyenne attaché aux particules. Cela indique un faible taux d'interactions avec l'environnement cytosolique. En 2012, Wu *et al*¹⁷ (même équipe), soutiennent que l'usage de ce type de revêtement permet d'obtenir des mesures du module visco-élastique de Young de gel de filaments d'actine en accord avec "ce qui est connu/attendu". D'autre part, Valentine *et al*¹⁸, après avoir comparé les mesures micro-rhéologiques obtenues dans des gels d'actine pour des billes carboxyle, carboxyle-BSA (Bovin Serum albumin) et carboxyle-PEG, montrent que le revêtement carboxyle diminue légèrement la quantité de mouvement des particules au temps long (1-10 secondes). *In-vivo*, la seule étude menée est celle de Daniels *et al*¹⁹ (*c.elegans* au stade unicellulaire) dans laquelle, ils rapportent que les billes de 100 nm carboxyle ont tendance à s'agréger aux parois des gonades ce qui n'est pas le cas pour les revêtement carboxyle-PEG. Les mesures mécaniques n'ont pas été faites dans les gonades ; aussi, aucune comparaison de valeur n'est possible.

16. TSENG, KOLE et WIRTZ 2002.

17. WU et al. 2012.

18. VALENTINE et al. 2004.

19. DANIELS, MASI et WIRTZ 2006.

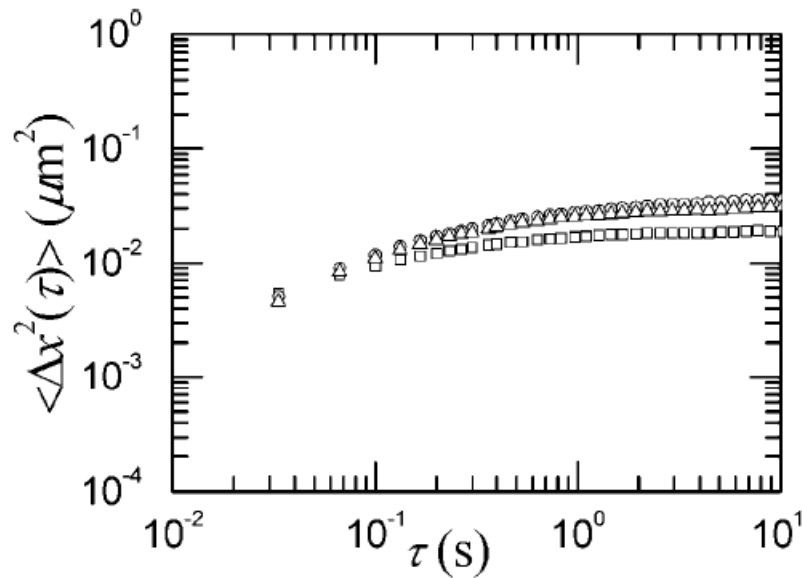


FIGURE 2.11 – Déplacement carré moyen mesuré pour des billes de $1\mu\text{m}$ de diamètre présentant différents revêtements chimiques : PEG (triangle), BSA (cercle), groupement carboxyle (carré). Extrait de (VALENTINE et al. 2004).

Au cours de ma thèse, je n’ai utilisé que des billes de polystyrène avec une surface carboxyle. Malgré quelques essais de différents protocoles, je n’ai jamais réussi à les revêtir de PEG. Aussi je ne peux conclure quant à l’influence de celui-ci sur les mesures mécaniques réalisées. Par contre si l’on se fie au travaux de Valentine *et al*²⁰, la différence de quantité de mouvements induite par la surface de carboxyle est très faible pour des déplacements carrés moyens de 100 ms (**figure 2.11**), temps de mesure maximal utilisé au cours de ces travaux.

2.3 Cahier des charges

L’étude des différentes propriétés et contraintes des méthodes et de l’embryon, ainsi que les essais réalisés sur des montages existants et non-dédiés aux mesures des propriétés mécaniques, m’ont permis d’établir un cahier des charges. Celui-ci définit les caractéristiques d’une plateforme expérimentale dédiée à la mesure des propriétés mécaniques de l’embryon de drosophile vivant. Ce montage combine du suivi de particule unique et une pince optique.

20. VALENTINE et al. 2004.

Imagerie de l'embryon

Le système doit :

- permettre l'imagerie du mésoderme avec un grandissement suffisant pour permettre la localisation d'objets intracellulaires ;
- permettre l'imagerie en épi-fluorescence de deux fluorophores, le plus indépendamment possible ;
- limiter l'excitation des fluorophores au-delà de la ceinture d'adhésion ;
- limiter le photo-blanchiment du fluorophores fusionné à la protéine d'intérêt.

Suivi de particule

La localisation des sondes est effectuée par analyse d'image. Aussi la caméra doit :

- être le plus sensible possible pour maximiser le signal des sondes ;
- avoir une fréquence d'acquisition permettant l'échantillonnage de signaux jusqu'à 15 Hz

Pince optique

La pince optique doit :

- être suffisamment puissante pour délivrer un minimum de 400 mW dans l'échantillon.
- Le piège optique doit pouvoir être déplacé dans le plan objet alors que l'échantillon/platine est immobile.
- Il doit être possible de déplacer périodiquement le piège optique sur des amplitudes inférieures à la centaine de nanomètres.
- Le trajet optique doit minimiser les pertes de la lumière réfléchi par la bille.
- Le détecteur de position doit être suffisamment sensible pour détecter la lumière réfléchi par la bille.

Ergonomie

L'ensemble du montage doit :

- être facilement utilisable par des personnes non-spécialisées en montage optique et en programmation ;
- limiter les opérations et donc le temps entre la préparation d'une expérience (repérage, réglage) et son acquisition. En effet, l'échantillon étant vivant, il change rapidement.

Chapitre 3

Dispositif expérimental

3.1 Montage optique

Tel que défini dans le cahier des charges (2.3), l'instrument doit permettre de réaliser de la vidéo microscopie de fluorescence à deux couleurs de manière indépendante et permettre l'utilisation simultanée d'une pince optique. La figure (3.1) représente le schéma du montage final.

Pour cela nous avons choisi d'utiliser un microscope inversé NIKON eclipse Ti équipé d'un objectif NIKON x100 N.A 1.49 DIC (région IV 3.1). Ce microscope se distingue par une construction modulaire permettant l'ajout aisé d'étages dichroïques. Pour rappel, un étage dichroïque a pour fonction de réfléchir certaines longueurs d'ondes et d'être transparent à d'autre, les deux parties du spectre ainsi séparées donnant lieu à deux faisceaux perpendiculaires. Il s'agit ici d'une définition volontairement large permettant de décrire la fonction globale des différents éléments optiques le composant : le miroir dichroïque ainsi que les filtres d'excitation et d'émission, dont les fonctions respectives sont décrites plus en détails sur la **figure (3.2)**. Dans le cas présent, deux étages dichroïques sont nécessaires, un étage étant dédié à l'imagerie de fluorescence (étage 2 région IV 3.1), dichroïque SIGMA (réfléchi 405 et 488nm) et l'autre à l'entrée du laser de la pince optique (étage 1 région IV 3.1) . Afin de pouvoir imager indépendamment deux fluorophores distincts, nous avons adjoint au microscope un module "dual optical path tube" Nikon permettant de brancher deux caméras sur une des sorties du microscope (région II 3.1). Il se compose d'un étage dichroïque (région II étage dichroïque 3 3.1) qui sépare les deux spectres différents émis par par deux fluorophores. Deux caméras EMCCD rapide Andor Lucas S (région II 3.1) enregistrent les images. L'utilisation du même modèle de caméras permet une superposition aisée des deux images obtenues (3.1.2). Nous avons aussi choisi d'introduire dans le microscope les lasers d'excitations via un module d'illumination par réflexion totale interne (bras TIRF - pour Total Internal Reflexion fluorescence) Nikon (région IV 3.1) qui permet de régler l'angle d'incidence et ainsi obtenir une illumination oblique de l'échantillon.

Au microscope proprement dit s'ajoutent deux montages optiques distincts permettant d'acheminer et de contrôler les lasers d'excitation (région III 3.1) de fluorescence et le

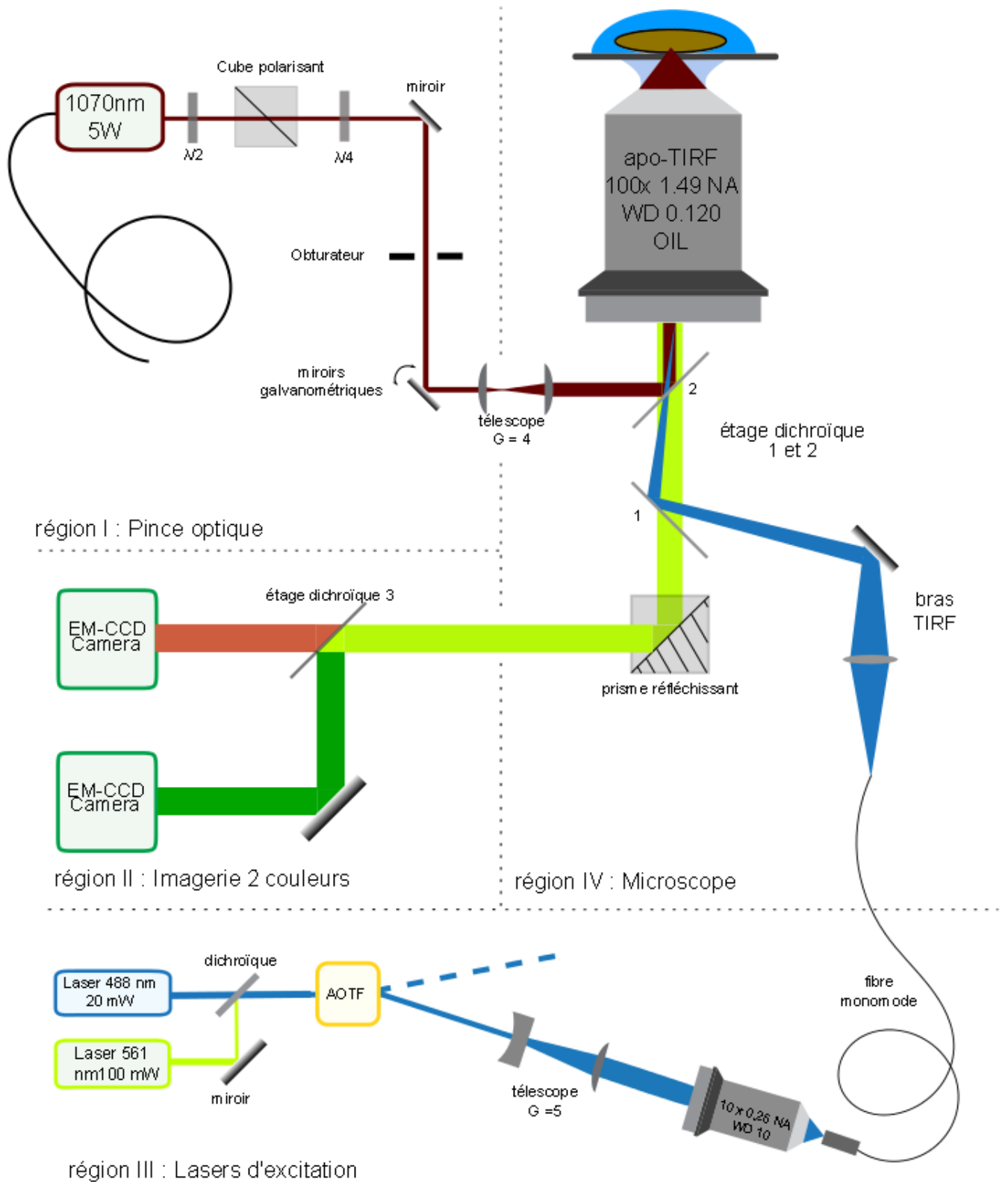


FIGURE 3.1 – Schéma du montage optique.

laser de la pince optique (région I 3.1).

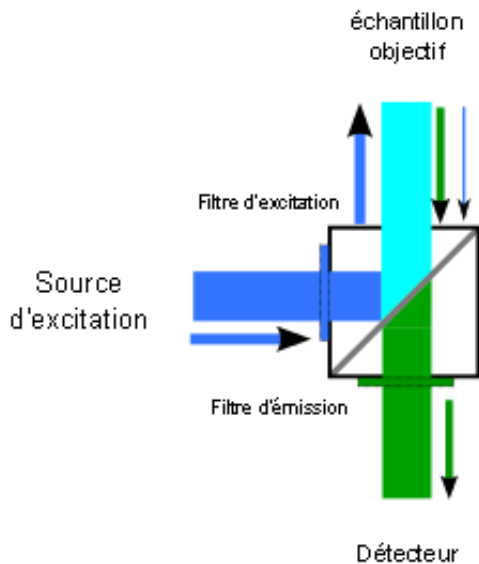


FIGURE 3.2 – Schéma d'un étage dichroïque plus communément appelé cube dichroïque. La lumière d'excitation est, dans un premier temps, filtrée par le filtre d'excitation (dans le cas d'une source large spectre type ampoule arc à mercure), les longueurs d'ondes sélectionnées sont ensuite réfléchies par le miroir dichroïque vers l'échantillon. La lumière de fluorescence émise par l'échantillon traverse le miroir dichroïque et les longueurs d'onde d'intérêt sont filtrées par le filtre d'émission, prévenant ainsi toute pollution de l'image par d'autres sources spectrales telle que l'endo-fluorescence ou le peu de lumière laser réfléchi qui arrive à ce point.

Chemin d'excitation (région III 3.1) :

Il se compose de deux lasers solides :

- un laser solid state de 20 mW de classe IIIb émettant à 488 nm de chez Coherent (saphire), utilisé le plus souvent pour exciter la fluorescence de protéine fusionnée à la célèbre protéine à fluorescence verte (Green fluorescent protein ou GFP).
- un laser solid state de 100 mW de classe IIIb émettant à 561 nm de chez Oxyus, utilisé le plus souvent pour exciter la fluorescence des billes de polystyrène utilisées comme sondes mécaniques.

Ces deux lasers sont ensuite superposés au moyen d'un miroir dichroïque, réfléchissant le 561nm. Ils traversent ensuite un module de modulation d'intensité acousto-optique (AOTF, AA optics nc400-650tn) permettant l'ajustement aisé de l'amplitude d'au moins quatre longueurs d'ondes différentes. L'AOTF est aussi utilisé comme obturateur déclenché par les caméras lors de la période d'exposition. Ainsi, l'échantillon n'est pas illuminé entre deux images, réduisant ainsi son photo-blanchiment. Une fois modulés, les lasers sont couplés à une fibre optique mono-mode à large bande de transmission (fournie avec le bras TIRF NIKON) qui amène la lumière dans le bras TIRF du microscope. Le module de couplage de la fibre optique se compose d'un télescope de Galilée (encombrement réduit), de grandissement afocal 5 et d'un banc opto-mécanique à trois axes de translation permettant de positionner finement le point focal d'un objectif Olympus 10X NA 0.3 sur le cœur biseauté de la fibre.

Chemin fibre optique (région I 3.1) :

Il se compose d'une source laser fibrée de classe IV (la cavité de résonance se composant d'une fibre optique dopée à l'ytterbium) émettant à 1070 nm (IPG laser YLM-5-SC) de puissance maximum 5W. Le laser est tout d'abord polarisé par une lame demi-onde ($\lambda/2$). Il passe ensuite par un cube (Thorlabs modèle...) séparateur de polarisation (élément II.C). La combinaison de ces deux éléments permet de séparer le faisceau en deux et de régler leur puissance respective. Un des deux faisceaux (le faisceau fille) est alors dirigé vers une fibre multimode utilisée pour partager/acheminer le laser vers un second montage (table optique différente) en cours de construction. La polarisation du faisceau mère est transformée de linéaire à circulaire par une lame quart d'onde (thorlabs). Il est ensuite acheminé à hauteur de l'étage dichroïque dédié (étage 1 région IV 3.1) par un périscope dont le miroir de sortie est composé d'un couple XY de miroirs galvanométriques 2 mm (6210H, Cambridge technology). Un télescope de type Newton de grandissement x4 placé en aval des galvanomètres permet d'agrandir le faisceau et de conjuguer le plan focal arrière de l'objectif du microscope avec le point central de la monture des galvanomètres.

3.1.1 Mode d'illumination

Comme nous avons pu le voir, l'embryon de drosophile se prête mal à l'imagerie plein champ de fluorescence (cf image GAP43). Par chance, notre principale région d'intérêt est la ceinture d'adhésion, apicale et proche de la lamelle (3-5 μm). J'ai donc pensé que l'utilisation d'une illumination oblique permettrait de minimiser l'excitation des protéines hors de la zone d'intérêt (partie basale de la cellule et yolk). Pour obtenir et contrôler l'angle de l'illumination oblique j'utilise une module TIRF (Total Internal Reflection fluorescence) initialement prévu pour l'excitation de fluorescence par champ évanescent. Comme on peut le voir sur les images de la figure 3.3, on observe une différence qualitative entre les images à gauche (A,C) où l'angle d'illumination est proche de l'axe l'optique et les images de droite (B,D) où on se trouve proche de l'angle critique. Par contre, on constate que l'illumination est moins homogène et le champ de vue réduit, ce qui est particulièrement visible en bas des images.

L'illumination oblique permet une amélioration de la qualité des images acquises au prix d'une légère réduction du champ de vue et d'une illumination anisotropique. Pour corriger ces défauts, il pourrait être intéressant d'implémenter une illumination oblique azimutale telle que proposée par Fioka *et al*¹.

Comme nous le verrons tout au long de ce manuscrit, la qualité d'imagerie du système est le facteur le plus limitant à l'obtention de données précises. Aussi nous avons choisi de développer un autre système d'imagerie de fluorescence basé sur une géométrie

1. FIOLKA et al. 2008.

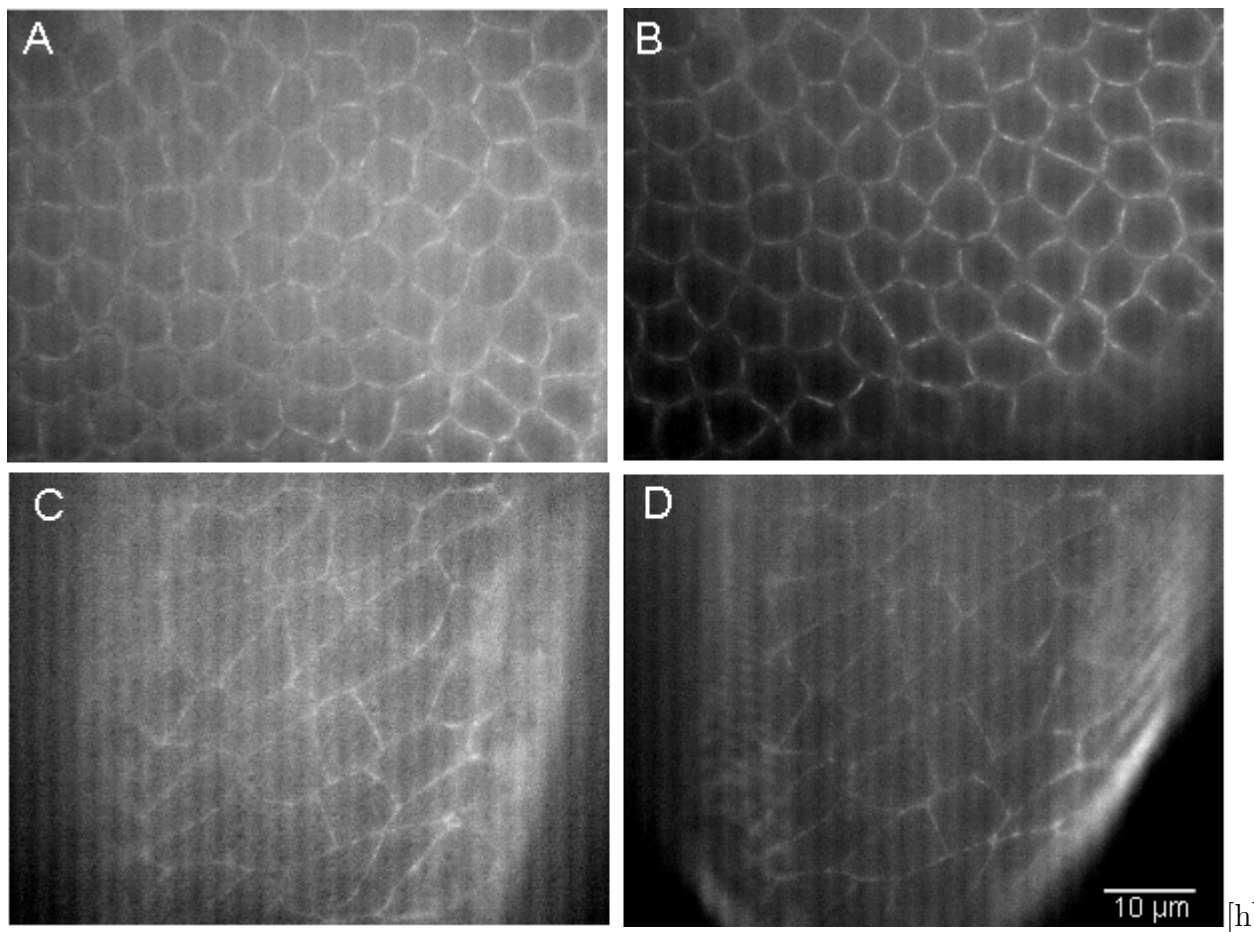


FIGURE 3.3 – Image d’embryon Cadherine GFP à différents angles d’illumination oblique. Chaque image est le résultat de la projection en intensité moyenne de 10 images prises en 50ms d’exposition. Les angles des images (A) et (C) sont moins importants que ceux de (B) et (D).

d'illumination à feuille de lumière (SPIM). Cette évolution est discutée plus en détails dans les perspectives.

3.1.2 Détection à deux caméras

Deux caméras sont utilisées pour imager simultanément les contours cellulaires et les billes dans deux canaux spectraux différents. Afin de s'assurer que les deux caméras enregistrent la même partie de l'échantillon, j'utilise une lamelle de verre sur laquelle a été déposée par évaporation une couche d'argent. Des trous, de diamètre allant de 20nm à 200nm et régulièrement espacés, ont ensuite été creusés par faisceau d'ions focalisés dans la couche d'argent. Cet échantillon a été réalisé à l'ISIS pour l'institut Fresnel dans le cadre d'une précédente collaboration.

L'imagerie de cette lamelle éclairée en transmission par une source blanche (ampoule halogène) permet d'obtenir un quadrillage (de $21,2 \mu\text{m}$ de côté) de sources ponctuelles large bande (visible des deux caméras) (**figure 3.4**), le diamètre des trous étant inférieur à la limite de diffraction. Ainsi, la superposition continue (en live) des images faites par les deux caméras (via la fonction overlay du programme d'acquisition μRheo) permet à l'utilisateur de régler aisément la superposition des caméras grâce au vis d'ajustement disponible sur le module dual-camera Nikon.

La localisation précise de chaque nano-trou permet de calculer, pour chacun d'eux et donc pour différentes région du champ, le décalage physique entre les deux images. Le décalage moyen ainsi obtenu est de $70 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$, ce qui est inférieur à la taille d'un pixel dans le plan image (100 nm). Sur la Fig 3.4 (B), on peut voir, représentées par des vecteurs (magnifié), les différences de positions à travers le champ. On constate ainsi que la différence est fonction de la position de la source dans le plan. Les images du nano-trou en haut à gauche ne sont espacées que de 35nm, alors que celles d'en bas à droite le sont de 127 nm. Cette dépendance de la distance en fonction du champ me permet de penser que la différence entre les deux images n'est pas uniquement une translation de plan parallèles. Malheureusement, le module dual-camera ne permet l'ajustement d'une image par rapport à l'autre que par translation, rendant ainsi impossible toute correction physique du problème (dans la mesure où l'on veut garder le module intact). Cette hétérogénéité de superpositions n'a toutefois pas constitué de limite pour nos mesures.

3.1.3 Contrôle et acquisition des données brutes.

Contrôle des caméras

Avoir deux caméras présente de nombreux avantages. Pour ce projet, il s'agit de pouvoir imager indépendamment un marquage d'intérêt biologique (protéine fusionnée à la gfp) et les mouvements de diffusion de billes fluorescentes. Quand j'ai démarré le projet, il n'existait pas de programme permettant de contrôler deux cameras Andor de

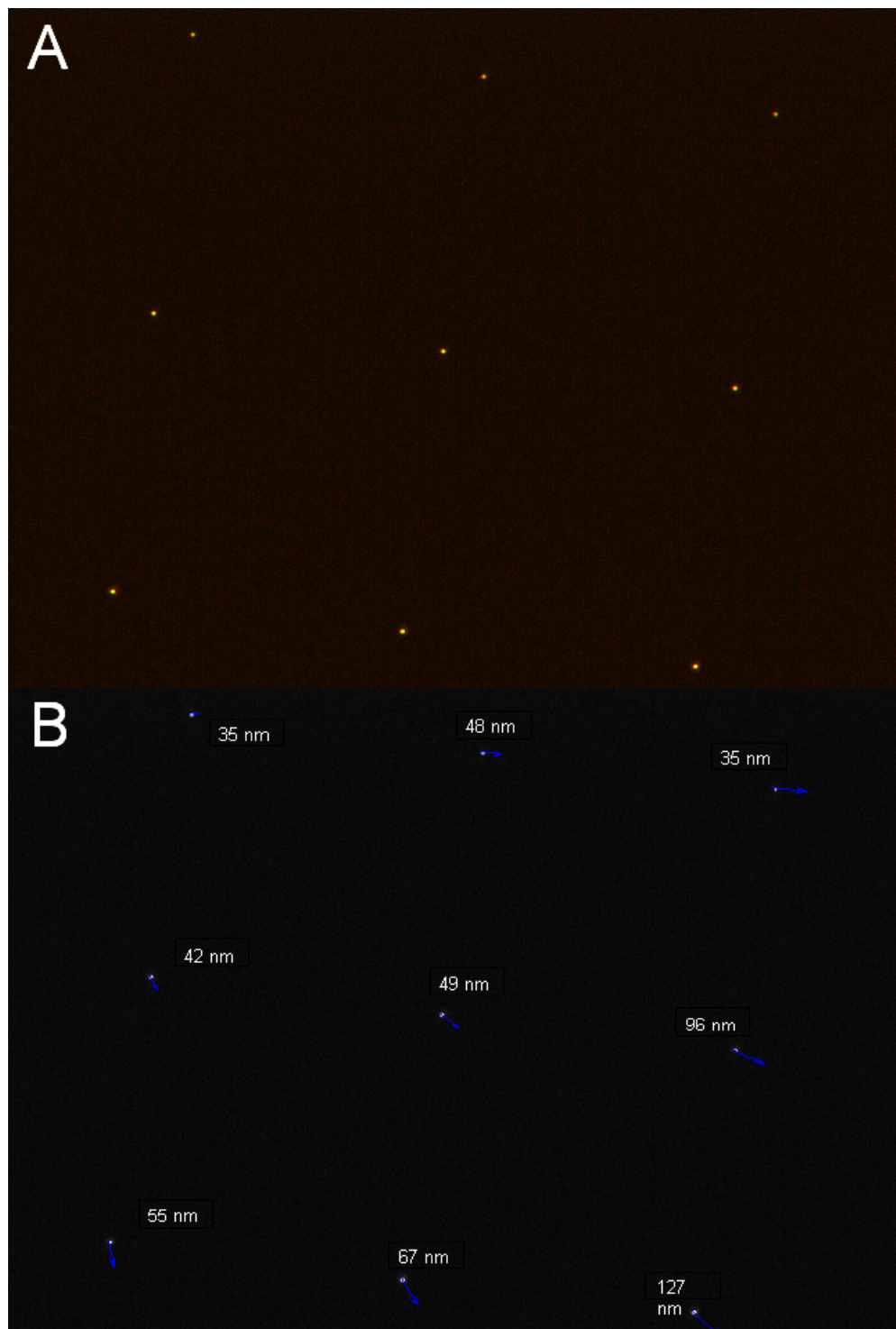


FIGURE 3.4 – Image des nano-trous. (A) Superposition des images issues des deux caméras. (B) Vecteurs de décalage entre les deux caméras (les vecteurs sont magnifiés).

manière simple. J'ai donc entrepris de développer un logiciel (μ Rheo) de contrôle des caméras à partir du SDK (version) (software développement kit) fourni par Andor. Il est écrit en C++ et utilise la bibliothèque d'interface graphique Qt (prononcer "cute") de Nokia.

MicroRheo crée, pour chaque caméra détectée, une liste des paramètres réglables. A chaque caméra détectée, est associée une zone de réglage des paramètres, une fenêtre d'affichage et un thread/processus (programmation multithread) dans lequel s'exécute la boucle d'acquisition. Bien que chaque caméra puisse être commandée indépendamment, l'unicité de l'interface permet l'émission d'ordres communs à toutes, typiquement des ordres tels que : "marche/arrêt". De plus et afin de faciliter la visualisation d'un fluorophore par rapport à l'autre, le logiciel rend aussi possible la superposition à la volée des flux vidéos issus des deux caméras. Enfin, l'utilisateur peut régler l'intensité des lasers d'excitation via un module de contrôle de l'AOTF.

Ce programme est théoriquement capable de gérer N caméras Andor, à partir du moment où elles sont compatibles avec le SDK. Il a d'ailleurs été déployé par Claire Chardès sur deux autres montages optiques :

- Sur un montage SPIM à une caméra ANDOR (modèle). A cette occasion, de nouveaux modules ont été ajoutés, tel que celui gérant une platine de déplacement en Z ainsi qu'un protocole séquentiel d'acquisition multi-couleur.
- Sur Montage SPIM-DSLM (Jérémy Capoulade et Claire Chardès) avec une caméra CMOS Hamamatsu. L'architecture de microRheo confinant les instructions spécifiques à la caméra dans un seul objet, il suffit alors de remplacer ce fichier par un fichier dédié à la nouvelle caméra pour pouvoir bénéficier de l'interface graphique existante. Ce montage est en cours de développement.

3.1.4 Contrôle de la pince optique

Afin de pouvoir déplacer la pince optique dans le plan objet, nous avons recours à un couple de miroirs galvanométriques dont l'angle de déflexion est contrôlé par une tension (volt) de commande. La génération de ces tensions de commandes est assurée par une carte National Instruments (NI) (PCI-6130) également capable d'enregistrer jusqu'à 8 entrées analogiques. J'ai développé, à partir de la bibliothèque de fonction DAQ-MX fourni par NI, un logiciel (AO2way) C++ d'interface Qt afin de pouvoir contrôler la génération des deux lignes de tension de chaque galvanomètre.

AO2way offre la possibilité à l'utilisateur de générer jusqu'à deux lignes indépendantes de motifs de tension périodiques : sinusoïde, dent de scie, créneau, dans une plage de +10 à -10 volts. Les motifs sont ajustables en phase, amplitude et niveau de base (offset). La fréquence du signal (f_{motif}) dépend du taux d'échantillonnage du motif (S_{buffer}) et de la fréquence de génération ou d'échantillonnage (f_{samp}) selon la relation :

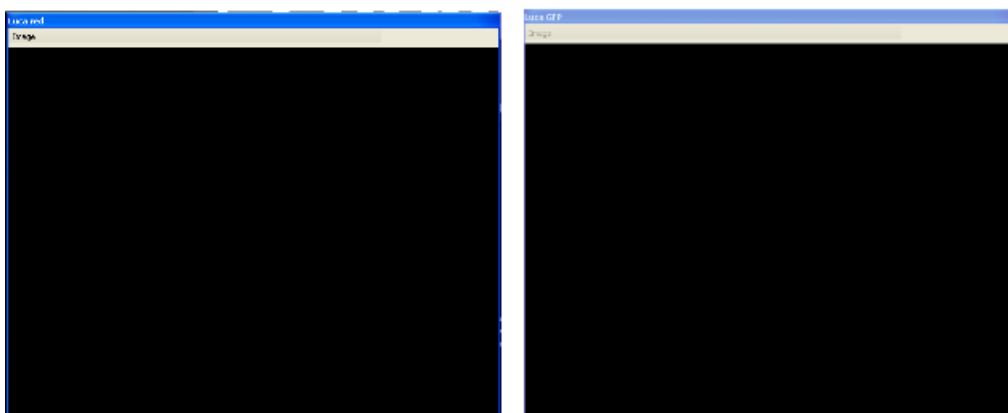
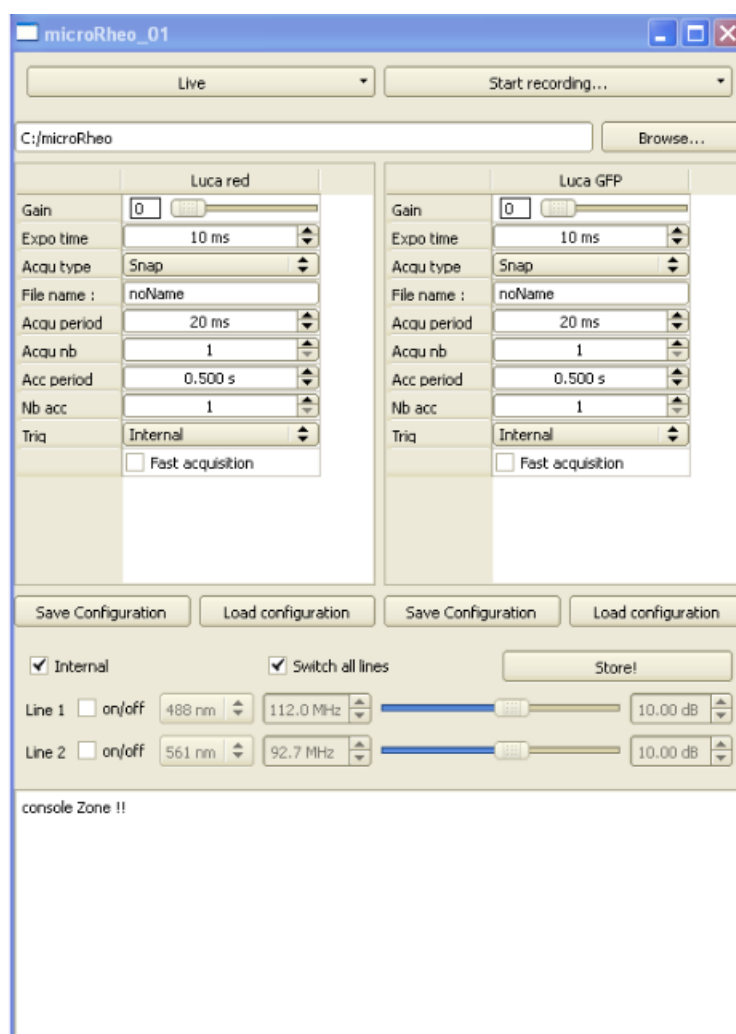


FIGURE 3.5 – Interface de contrôle et d'affichage des caméras.

$$f_{motif} = \frac{S_{buffer}}{N_{motif}} \times f_{samp} \quad (3.1)$$

où N_{motif} est le nombre de répétitions du motif dans le buffer.

Le logiciel permet aussi d'enregistrer numériquement avec un échantillonnage propre (indépendant de celui de la génération) jusqu'à 8 entrées de tensions analogiques. À l'origine, cette fonction était destinée à l'enregistrement des données en provenance du détecteur de position de la pince optique, mais comme expliqué plus en détail en **section 3.3.3** cette fonction n'est plus utilisée.

Le logiciel contrôle aussi l'ouverture et la fermeture de l'obturateur disposé sur la ligne infrarouge, ce qui permet de limiter facilement l'exposition de l'échantillon au laser.

3.1.5 Pré-traitement des données

Suivi de particule.

Si on désire suivre un grand nombre de particules, il est beaucoup plus efficace d'utiliser un algorithme dédié à cet usage. Pour l'obtention des trajectoires, nous avons recours à l'algorithme MTT (pour multiple-particle tracing) développé par Sergé *et al*². Il a été conçu pour pouvoir suivre une haute densité de particules brillantes et intermittentes telles que les Quantum Dots. À cet effet, deux de ses étapes le distinguent des algorithmes classiques :

- **La boucle de déflation.** Il s'agit d'une étape où pour une image, les pics gaussiens détectés lors de la première phase de détection sont soustraits à l'image pour permettre, lors d'un deuxième passage, de distinguer les pics moins intenses qui étaient alors masqués. Cette opération est répétée jusqu'à ce que l'image résultante ne soit plus composée que de bruit. Cette particularité permet de détecter presque 100% des pics présents sur une image simulée avec un niveau de bruit de 25dB **figure (3.7)** et diminue la sensibilité à la concentration de cibles.
- **Optimisation de la reconnection des particules.** Cette partie permet de reconnecter une particule qui n'aurait pas été détectée pendant un certain nombre d'images. Pour ce faire, une aire de probabilité de présence est définie à partir des caractéristiques de diffusion antérieure à la disparition. Cette étape s'avère nécessaire lors du suivi de quantum dots caractérisés par un fort clignotement, mais est peu utile dans le cas de sphères fluorescentes qui ne clignotent pas

Aucune modification n'a été apportée à l'algorithme MTT, seule une interface graphique codée sous Matlab à été greffée aux scripts existants afin de faciliter la

2. SERGÉ et al. 2008.

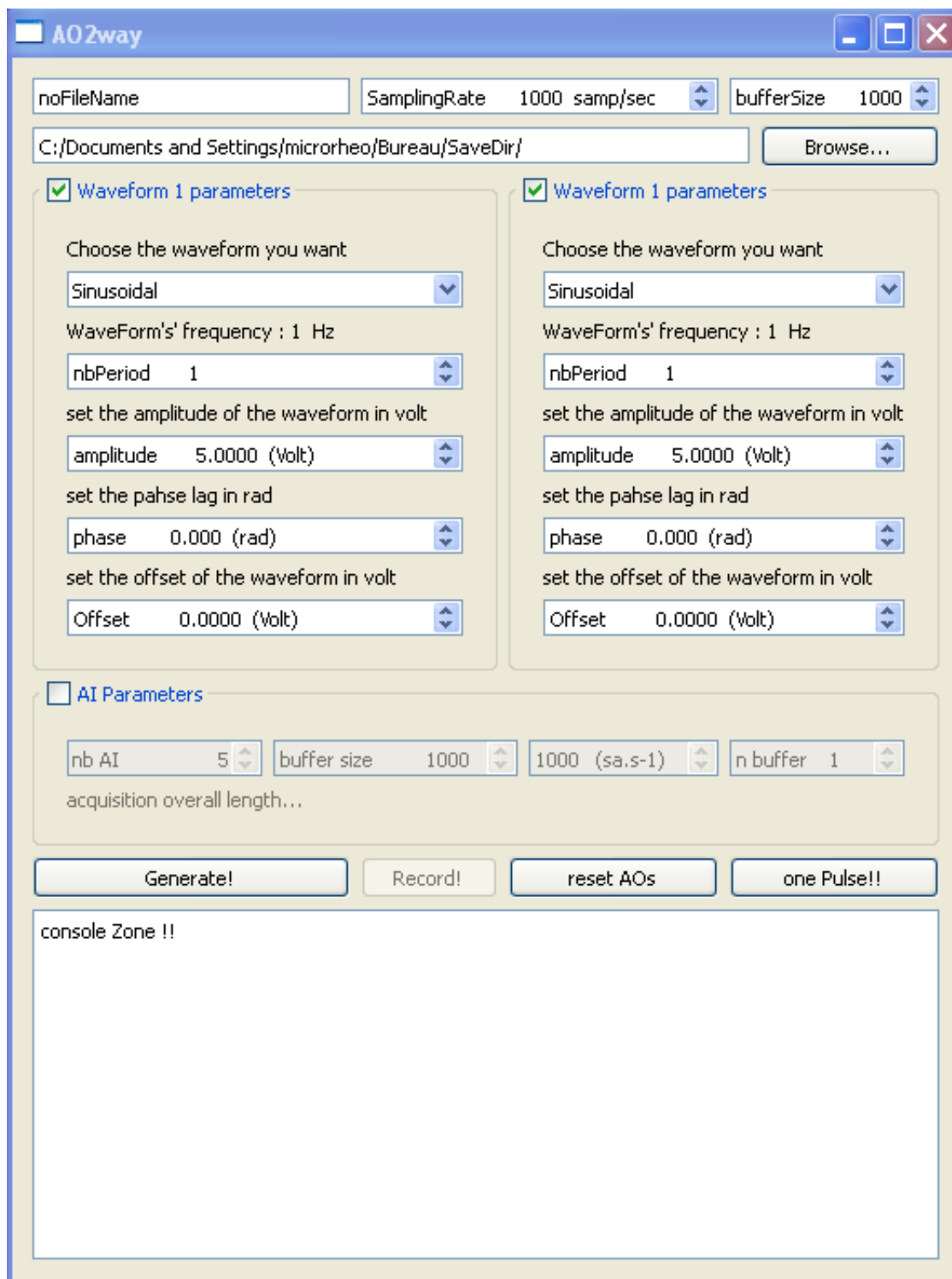


FIGURE 3.6 – Interface de contrôle des miroirs galvanométriques.

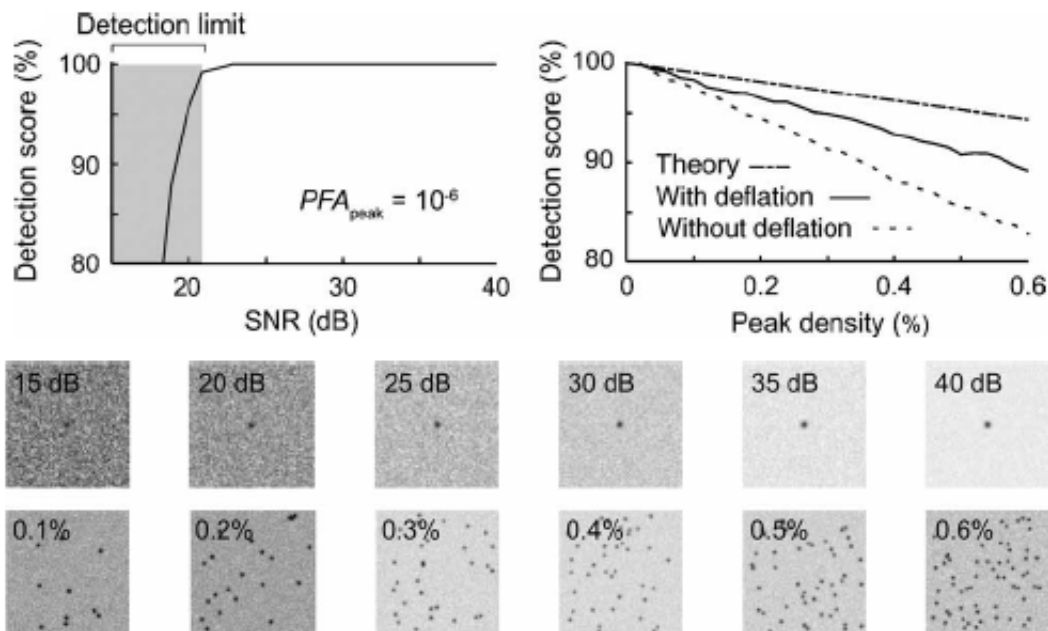


FIGURE 3.7 – Efficacité de détection de l’algorithme MTT. Image tirée de Sergé *et al* (SERGÉ *et al.* 2008)

modification des paramètres ainsi que permettre une pré-visualisation des résultats.

Autre

La plupart des méthodes de pré-analyse des données ont été codées sous matlab et seront détaillées dans les sections appropriées. Seule exception, le logiciel libre et collaboratif ImageJ est utilisé pour réaliser les kymographes, les projections et les sélections de régions d’intérêt (CROP).

3.2 Suivi de particules

Toute particule immergée dans un fluide est soumise à l’agitation thermique qui se traduit par son déplacement aléatoire. Aussi appelé mouvement brownien, ce déplacement aléatoire conduit la particule à explorer son environnement. L’analyse statistique de la trajectoire de la particule nous renseigne sur le milieu qu’elle explore.

3.2.1 Diffusion et propriétés mécaniques

Milieu visqueux

Le déplacement d'une particule dans un liquide entraîne, par friction avec les constituants du milieu, une force qui s'oppose à son mouvement. Cette force de traînée (*drag force* en anglais) dépend du type d'écoulement du fluide autour de l'objet. Le *nombre de Reynolds* permet de connaître le régime d'écoulement d'un système. Il peut s'écrire :

$$R_e = \frac{\rho L v}{\eta} \quad (3.2)$$

avec ρ la densité du milieu, η sa viscosité, L la dimension caractéristique de l'objet et v sa vitesse. Il représente le rapport entre les forces d'inertie et de viscosité. À faible nombre de Reynolds ($R_e \ll 1$), le flux est laminaire et non-turbulent, l'inertie du système est aussi négligeable³. Pour une sphère de $1 \mu\text{m}$ de diamètre se déplaçant à une vitesse de $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans de l'eau, $R_e = 10^{-11}$.

Dans le régime laminaire, la force de traînée est proportionnelle à la vitesse du déplacement (loi de Stokes) :

$$F = -\gamma v_{part} \quad (3.3)$$

avec γ le coefficient de traînée (*drag coefficient*), v_{part} la vitesse de déplacement de la particule et η la viscosité du liquide. Pour une particule sphérique, le coefficient de traînée s'écrit :

$$\gamma = 6\pi R_{part}\eta \quad (3.4)$$

avec R_{part} le rayon de la particule et η la viscosité du liquide.

Lorsqu'elle est soumise aux fluctuations thermiques du milieu, la particule suit un mouvement erratique appelé diffusion, auquel s'oppose la friction du milieu. Einstein a montré⁴ qu'il existe une relation fondamentale entre friction et diffusion :

$$D = \frac{K_b T}{\gamma} \quad (3.5)$$

où D est le coefficient de diffusion de la particule, K_b la constante de Boltzman et T la température du milieu. On voit ainsi qu'une particule diffuse d'autant plus vite que γ est petit et que la température du milieu est grande. Pour une particule sphérique, γ est connue (eq :3.4 ; on obtient donc la relation de Stoke-Einstein :

$$D = \frac{K_b T}{6\pi R_{part}\eta} \quad (3.6)$$

3. PURCELL 1977.

4. EINSTEIN 1956.

où on voit que la viscosité du liquide entrave la diffusion et qu'une sphère diffuse d'autant plus qu'elle est petite.

Notons que dans le cadre d'un fluide présentant des propriétés visco-élastiques, et à faible nombre de Reynolds, la relation de Stokes-Einstein a récemment été généralisée par Mason et Weitz⁵ en 1995 afin de relier le déplacement carré moyen (équivalent au coefficient de diffusion) au module complexe de visco-élasticité.

3.2.2 Déplacement carré moyen

Une particule diffusant dans un milieu visqueux est caractérisée par son déplacement carré moyen (MSD pour Mean Square Displacement) $\langle r^2 \rangle = \rho(t)$ qui est relié au coefficient de diffusion par :

$$\langle r^2 \rangle = N2Dt \quad (3.7)$$

où N est le nombre de dimension du système, D le coefficient de diffusion et t le temps. On peut, au vu de cette équation, considérer le coefficient de diffusion d'une particule (D) comme son taux/vitesse d'exploration du milieu. Pour un ensemble de particules identiques venant à diffuser depuis un point source, le coefficient de diffusion représente alors la vitesse d'extension de l'aire du cercle dans lequel on les trouve (tache d'encre qui s'étale).

On mesure de la MSD d'une particule à partir de sa trajectoire⁶ avec :

$$\rho(t) = \langle (r(t) - r(0))^2 \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} (r(t+t') - r(t'))^2 dt' \quad (3.8)$$

où $r(t)$ est la position au temps t de la particule. Pour des trajectoires finies et discrètes à deux dimensions, on calcule le déplacement carré moyen au moyen de :

$$\hat{\rho}(n\Delta t) = \frac{1}{(N-n)} \left(\sum_{i=1}^{N-n} (x_{i+n} - x_n)^2 + (y_{i+n} - y_n)^2 \right) \quad (3.9)$$

où N est le nombre total de positions que comporte la trajectoire, Δt la durée minimale séparant deux positions (le temps d'acquisition) et i l'indice des images. En calculant $\hat{\rho}(n\Delta t)$ pour différentes valeurs de n , on peut alors tracer une courbe de MSD représentant l'évolution de la distance moyenne au carré parcourue par la particule pour différentes durées $n\Delta t = \tau$.

5. MASON et WEITZ 1995.

6. QIAN, SHEETZ et ELSON 1991.

Signature des différents types de mouvement

Le mouvement d'une particule peut être modifié par son environnement. Par exemple, si la particule diffuse dans un fluide soumis à un écoulement, l'aire ainsi explorée croît plus vite que t . Au contraire, si la particule rencontre des obstacles, cette aire croît moins vite que t . Ainsi on se rend compte que l'analyse de la MSD permet de distinguer différents types de mouvements et donc différents contextes mécaniques. Dans certains cas particuliers, il est possible de proposer une formule analytique caractéristique d'un type de diffusion. Je présente ici les plus courants :

- La diffusion simple et plane d'une particule dans un milieu visqueux, diffusion dite *libre* ou *normale*.

$$\rho(t) = 4Dt \quad (3.10)$$

- La diffusion libre à laquelle s'ajoute un flux ou une dérive de vitesse moyenne v .

$$\rho(t) = 4Dt + (vt)^2 \quad (3.11)$$

- La diffusion anormale (*anomalous diffusion*), au sein d'un milieu dans lequel la particule rencontre des obstacles la piégeant transitoirement.

$$\rho(t) = 4Dt^\alpha \text{ avec } \alpha < 1 \quad (3.12)$$

- La diffusion libre dans un espace confiné de dimension caractéristique L , duquel la particule ne sort pas.

$$\rho(t) = \frac{L^3}{3} \left(1 - \exp^{-\frac{12Dt}{L^2}} \right) \quad (3.13)$$

À l'opposé d'une diffusion dans un milieu visqueux, la MSD d'une particule au sein d'un milieu élastique est une constante en tout temps (**figure 3.8**). En effet, à chaque fluctuation thermique, le milieu réplique par une force égale et de direction opposée. La valeur du déplacement carré moyen dépend uniquement de l'énergie thermique $K_b T$ à laquelle s'oppose l'élasticité du milieu tel que :

$$\rho(t) = cte = \frac{K_b T}{6\pi G'(\omega) R_{part}} \quad (3.14)$$

où $G'(\omega)$ est le module élastique exprimé en fonction de la fréquence.

Pour un milieu visco-élastique, la MSD se compose donc de droites pour les régimes visqueux et de plateaux pour les régimes élastiques. Mais en réalité, les deux régimes ne sont pas aussi distincts, aussi la MSD présente le plus souvent les caractéristiques d'une diffusion anormale (**eq 3.12**).

On distingue, en fonction de la dépendance temporelle de la MSD, trois types de régimes diffusifs. Cette distinction purement mathématique ne fait aucune hypothèse sur le milieu, mais permet d'effectuer un premier tri des particules en :

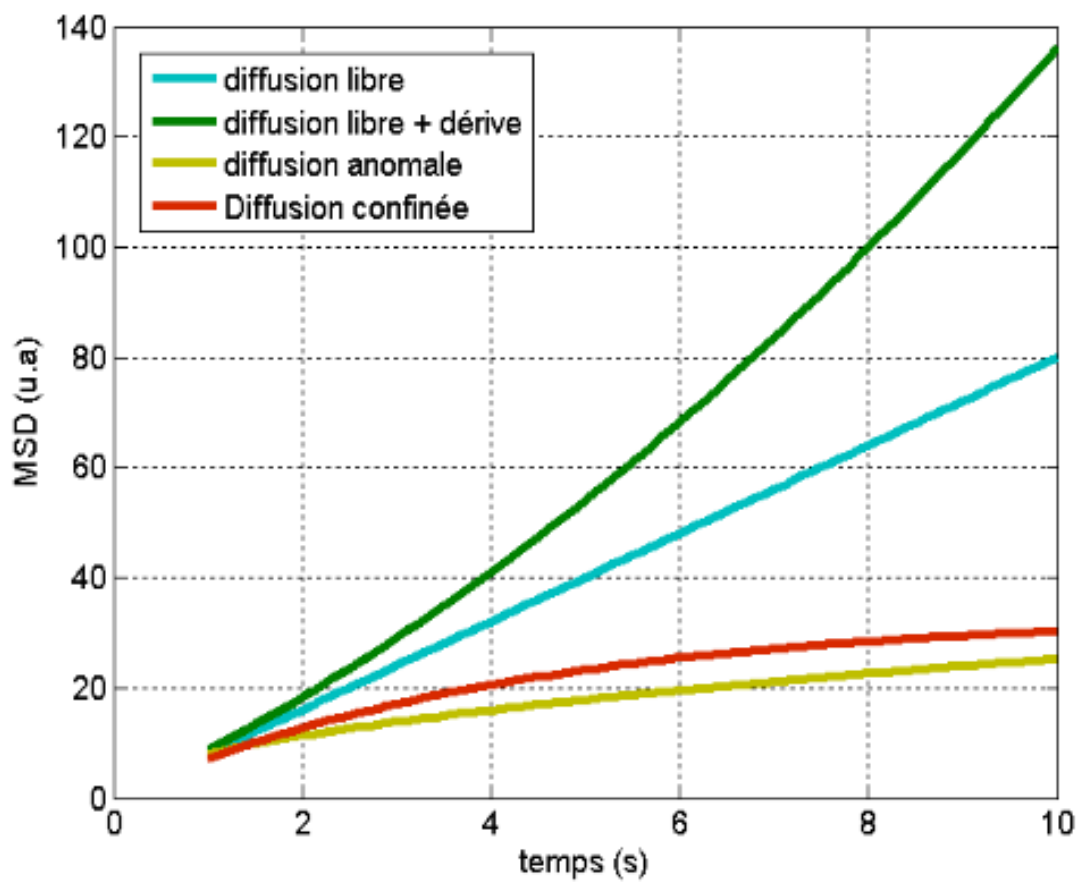


FIGURE 3.8 – Courbe théorique de MSD pour différents modèles de diffusion.

- Régime de diffusion libre, où on observe une dépendance linéaire au temps ;
- Régime sur-diffusif où un mouvement (typiquement un mouvement de dérive) s'ajoute à la diffusion libre...(régime sur-linéaire) ;
- Régime sous-diffusif où la diffusion libre est gênée (diffusion anormale, confinée...). On y observe une dépendance en loi de puissance avec un exposant inférieur à 1.

Pour catégoriser les trajectoires j'utilise la méthode statistique développée par Kuzumi⁷ et détaillée en section (3.2.3).

Sources d'erreur sur la MSD expérimentale

La MSD expérimentale est sujette à différentes sources d'erreurs.

- **L'erreur statistique.** Elle provient du fait que les points composant la MSD sont le résultat d'une moyenne d'un nombre fini de mesures expérimentales. Aussi, leur erreur dépend du nombre de mesures moyennées (**eq 3.9**). Pour une trajectoire contenant N points et dans le cas extrême où on voudrait calculer la MSD pour la durée de $(N - 1)\Delta t$, la moyenne ne comprendrait que deux points. Or les positions sont aléatoires, aussi les derniers points de la MSD n'ont pas de sens physique. De manière générale on considère⁸ que seul le premier quart d'une courbe de MSD est statistiquement significatif. Il est toutefois possible de réduire l'erreur statistique en moyennant plusieurs MSD avec comme condition le fait que le milieu soit homogène en tout point i.e toutes les particules diffusent dans le même milieu. Cette condition est rarement satisfaite dans un échantillon biologique.
- **La précision de pointé.** Même si les méthodes de suivi de particules uniques sont basées sur une super-localisation (détermination de la position d'un objet avec une précision meilleure que celle imposée par la limite de diffraction) des particules suivies, leurs localisations demeurent entachées d'erreurs qui sont propres au procédé et aux conditions d'acquisition. Si la position x d'une bille est connue avec une incertitude de δ_x , l'erreur va introduire sur la MSD l'ajout d'un terme constant⁹ $2\delta_x^2$. Par extension, une bille immobile ($D = 0$) pourra être considérée comme mobile puisque de MSD non nulle. La précision de pointé fixe une quantité de mouvement minimale en dessous de laquelle la particule doit être considérée comme immobile. Si cette quantité est connue, il est alors possible d'établir le coefficient de diffusion minimal mesurable :

$$D_{min} = \frac{\delta r^2}{\Delta t} \quad (3.15)$$

7. KUSUMI, SAKO et YAMAMOTO 1993.

8. SAXTON 1997.

9. MARTIN, FORSTNER et KÄS 2002.

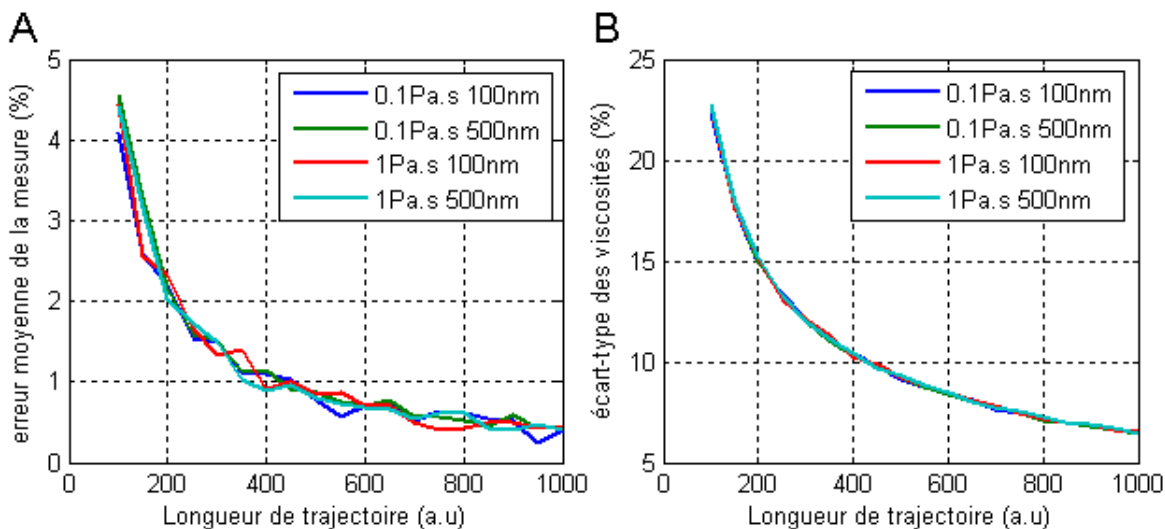


FIGURE 3.9 – Conséquence de l’erreur statistique sur la mesure de la viscosité (i.e du coefficient de diffusion). Simulation de 10000 trajectoires aléatoires par chaque longueur. (A) Erreur en pourcents faite sur la mesure du coefficient de viscosité. (B) Écart-type en pourcentage de la mesure.

où δr^2 représente la norme des erreurs de pointé dans toutes les directions, et Δt la durée utilisée pour calculer D . La précision de pointé étant propre à chaque particule suivie (elle dépend du SNR du nombre de photons détectés en particulier), il convient alors de calculer D_{min} pour chacune d’entre elles.

- **Influence du temps d’acquisition.** La mesure de la position d’une particule est déduite de son image, or l’acquisition de celle-ci n’est pas instantanée. Ainsi durant le temps où la caméra est exposée à la lumière émise par la particule (temps d’exposition : t_{expo}), celle-ci est toujours soumise à l’agitation thermique et est donc toujours en mouvement. L’image ne représente donc que que la position moyenne de la particule :

$$\langle r(t) \rangle = \frac{1}{t_{expo}} \int_{-t_{expo}/2}^{t_{expo}/2} r(t) dt \quad (3.16)$$

où $r(t)$ est la position réelle de la bille et $\langle r(t) \rangle$ la position mesurée de la bille. Pour une particule diffusant librement, la contribution de cet erreur s’écrit¹⁰ :

$$\rho(t) = 4Dt - \frac{4Dt_{expo}}{3} \quad (3.17)$$

ce qui se traduit par une translation verticale, traitée de la même manière que celle introduite par l’erreur de pointé. Par contre, pour des types de mouvements plus

10. GIESEMANN et al. 2003.

complexes, l'influence du temps d'acquisition est plus subtile. Ainsi, dans le cas d'un mouvement dirigé, l'effet est négligeable dès lors que la vitesse d'entraînement v est négligeable devant la contribution diffusive : $v \ll \sqrt{4D/t_{expo}}$ ¹¹. Pour une diffusion confinée, l'effet est négligeable quand le temps caractéristique de confinement est supérieur au temps d'exposition. Dans le cas contraire, on ne mesure que la position du centre du confinement. Pour un confinement permanent, la MSD est constante, et pour un confinement auquel se superpose une diffusion lente, seule cette dernière sera visible.

3.2.3 Différenciation des types de mouvements

Pour différencier entre les trois différents régimes de diffusion (sur-diffusion, diffusion, sous-diffusion) sans avoir à faire d'hypothèse sur le type de mouvement (i.e sans faire d'ajustement), Kuzumi *et al* ont développé une méthode statistique basée sur la forme de la MSD¹².

Comme ces différents régimes sont caractérisés par des dépendances au délai/temps différentes, Kuzumi propose de tester la linéarité de la MSD en calculant le rapport entre un coefficient de diffusion au temps long D_{1-n} (calculé entre le $n^{ième}$ point et le second) et le coefficient de diffusion instantanée D_{1-4} (pente entre le quatrième et le second point) :

$$RD(N, n) = \frac{MSD(N, n)}{4D_{1-4}n\delta t} \quad (3.18)$$

où N est le nombre de positions de la trajectoire, δt l'intervalle de temps entre chaque pas. Pour une MSD parfaite de trajectoire infinie, RD est égal à un pour une diffusion libre, supérieur à un pour une sur-diffusion et inférieur à un pour un régime sous-diffusif. Seulement, les trajectoires sont de tailles finies et on observe une variation d'origine statistique entre différentes MSD pourtant calculées à partir d'un même type de mouvement (figure 3.10 A).

Cette variation statistique entraîne que RD selon sa valeur représente la probabilité pour la trajectoire d'appartenir à l'un ou l'autre des régimes. Pour définir correctement l'intervalle des valeurs de RD qui correspond au régime de diffusion libre, on a recours à la simulation informatique. Un grand nombre de diffusions sont simulées (D identique pour toutes) et pour chacune d'entre elles, on calcule le RD correspondant pour un n donné. On obtient ainsi une distribution (figure 3.10 (B)) qui délimite l'ensemble des valeurs prises par $RD(N, n)$. Ainsi, toute trajectoire pour laquelle, $RD(n, n)$ est situé au dehors de cet ensemble est considérée soit comme appartenant au régime sur-diffusif, soit comme appartenant au régime sous-diffusif, selon que la valeur est respectivement supérieure ou inférieure. Par commodité, nous définissons l'intervalle diffusif comme situé

11. BOUZIGUES 2006.

12. KUSUMI, SAKO et YAMAMOTO 1993.

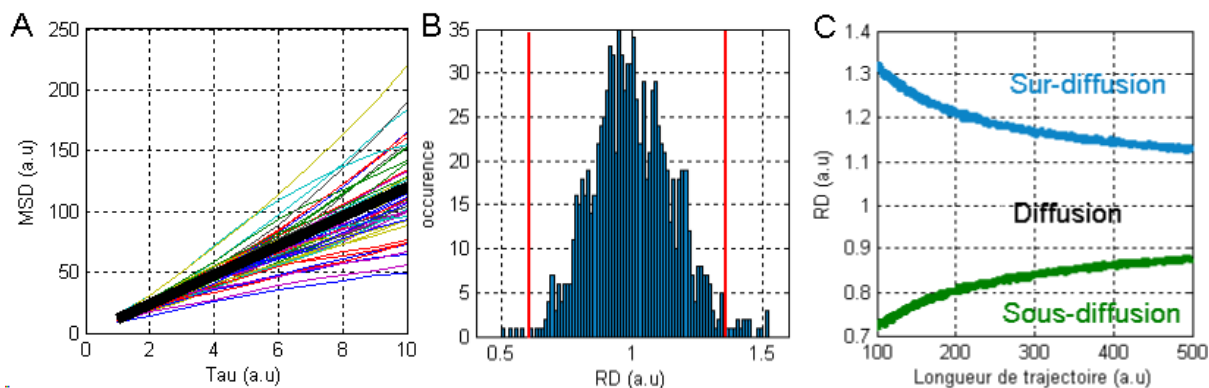


FIGURE 3.10 – (A) MSD de 100 trajectoires aléatoires simulées avec le même coefficient de diffusion. La courbe noire représente la MSD théorique/attendue. (B) Histogramme des $RD(N,n)$ correspondants. Les lignes rouges délimitent la zone contenant 95% des valeurs. (C) Valeurs de RD ($n = 10$) marquant la limite entre différents régimes de diffusion en fonction de la longueur de trajectoire. 10000 trajectoires ont été simulées pour chaque longueur (N)

entre les deux positions qui encadrent 95% des valeurs de $RD(n,n)$ comme illustré sur la **figure 3.10** par les lignes rouges.

$RD(N,n)$ dépend de la longueur de la trajectoire car l'erreur statistique diminuant avec N , la distribution se rétrécit d'autant et les bornes se rapprochent. Aussi, on répète la simulation pour tout un ensemble (expérimentalement réaliste) de longueurs, Chaque simulation donnant les frontières propres à cette longueur. On obtient ainsi les deux courbes de la figure ?? qui nous permettent d'identifier, avec une probabilité de 95%, le régime de diffusion.

Cas particulier des particules sur-diffusives

Les particules sur-diffusives ont été considérées dans ce travail comme ayant pour origine un mouvement de diffusion libre de coefficient de diffusion D auquel s'ajoute un écoulement de vitesse v dont La MSD théorique s'écrit (**équation 3.11**). On comprend alors que si l'on mesure D en mesurant la pente à l'origine de MSD ($D = \frac{MSD}{4\Delta\tau}$) on obtient une valeur surestimée puisqu'au régime linéaire s'ajoute un régime quadratique $v^2\tau^2$. Par la suite, cela se traduit par une valeur de viscosité sous-estimée. Par souci d'économie de temps de calcul lors du traitement, les MSDs de ces trajectoires n'ont pas été ajustées à l'aide de leur formule théorique. Leur coefficient de diffusion est calculé de la même manière que pour les particules diffusant librement, et leur vitesse de dérive est estimée de manière très grossière :

$$v = \sqrt{MSD(\tau_{max}) - \tau_{max}D_{origine}} \quad (3.19)$$

Où τ_{max} est le décalage maximal pour lequel la MSD a été calculée, et $D_{origine}$ le coefficient de diffusion à l'origine. Cette estimation comporte un biais puisque $D_{origine}$ est lui-même surestimé en raison de la dérive. Mais nous considérons ce biais comme négligeable pour les vitesses et échelles de temps rencontrées au cours des expériences ($v \sim 100 \text{ nm.s}^{-1}$ et $\tau_{max} \sim 250 \text{ ms}$).

Comme présenté dans la partie résultats, les billes sur-diffusives sont majoritaires dans nos expériences. Aussi j'ai développé une méthode empirique de correction des valeurs de viscosités. Elle consiste en un calcul de la MSD théorique pour différentes valeurs de viscosités et de vitesses de dérives. Ensuite, pour chacune de ces courbes, les valeurs de viscosités et de vitesses sont mesurées de la même manière que pour les courbes expérimentales. À partir de ces valeurs, on trace un abaque qui établit la relation entre la vitesse de dérive absolue (considérée comme identique à celle estimée expérimentalement), la viscosité expérimentale et la viscosité absolue (**figure 3.11**).

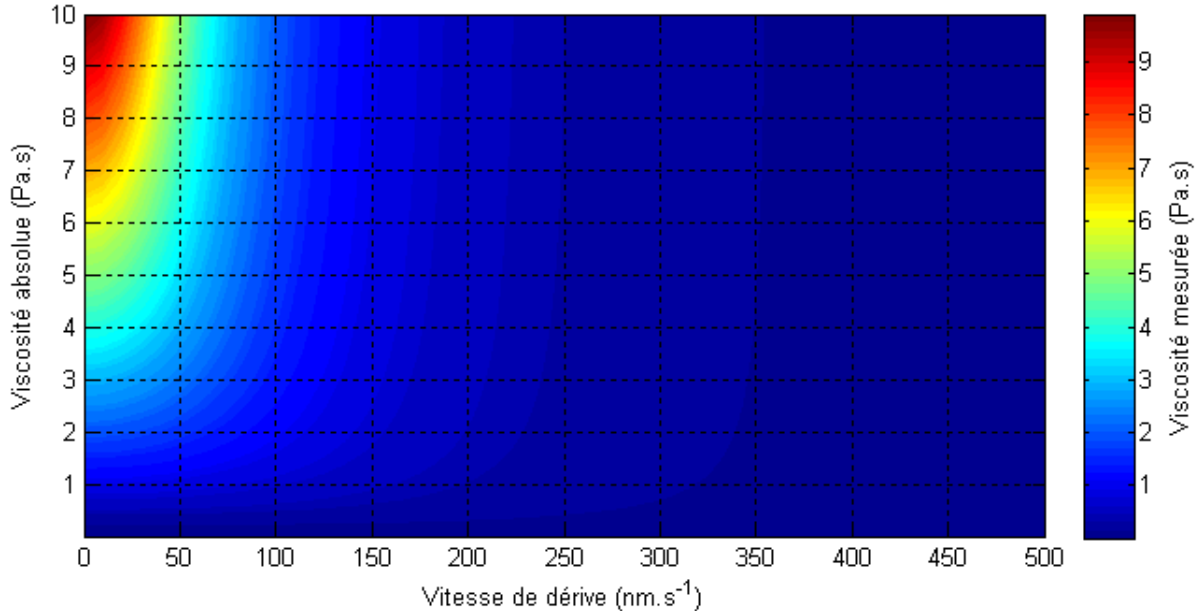


FIGURE 3.11 – Abaque permettant de corriger les valeurs de viscosité mesurées pour les particules sur-diffusantes en fonction de la vitesse de dérive estimée.

Une méthode plus rigoureuse de mesure de la dérive et de la viscosité absolue est actuellement en cour d'implémentation.

3.2.4 Calibration

Afin d'estimer la précision des mesures effectuées par suivi de particule unique, des expériences de calibration ont été réalisées. Elles consistent à mesurer la viscosité de différentes solutions de glycérol plus ou moins dilué à une température (de la pièce) de 20°C . Les résultats sont résumés dans le tableau (3.12).

Φ bille (nm)	W/W (%)	N billes	η mesurée (Pa.s)	std (%)	η attendu (Pa.s)
100	83	268	0.106 ± 0.036	34	0.086
500	83	115	0.08 ± 0.01	12.5	0.086
100	87	555	0.15 ± 0.03	20	0.144
500	87	268	0.13 ± 0.017	13	0.144
100	100	268	1.3 ± 0.3	23	1-1.4
500	100	268	1.01 ± 0.12	12	1-1.4

FIGURE 3.12 – Valeurs de viscosités dynamiques mesurées dans différentes solutions de glycérol.

Dans l'ensemble, les mesures se rapprochent des valeurs attendues, pour les deux tailles de billes utilisées (100 et 500nm de diamètre). Les écarts aux valeurs attendues, peuvent en partie être expliqués par des imprécisions quant aux proportions des mélanges et à leur température durant la mesure. Comme on peut le voir sur la figure (3.13), la viscosité d'une solution très concentrée (>80%) de glycérol varie fortement pour de petits écarts de températures et/ou de concentration.

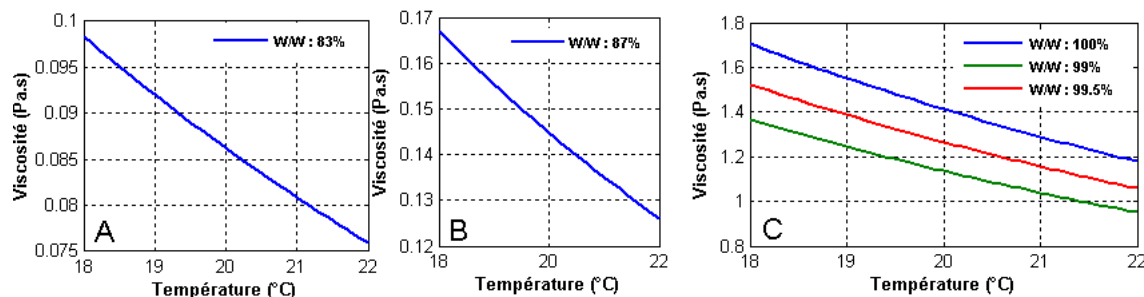


FIGURE 3.13 – Evolution de la viscosité d'une solution aqueuse de glycérol pour différentes concentrations W/W en fonction de la température. Courbes calculées à partir des formules proposées par Cheng (CHENG 2008).

Les écarts-types mesurés sont en partie dus aux variations du diamètre des billes et à l'erreur statistique.

- Les billes (fluorosphères de chez *molecular probes*) présentent respectivement un écart-type de 6% et 3% pour les billes de 100 et 500 nm de diamètre. En conséquence, l'erreur sur la variation attendue pour une mesure de viscosité est estimée par :

$$\Delta\eta = \frac{2K_b T}{6 * \pi * D * R^2} \Delta R \quad (3.20)$$

développement limité au premier ordre de la relation de Stokes-Einstein (3.6). $\Delta\eta$ vaut respectivement 6% et 12% pour les billes de 500 et 100nm.

- Comme montré sur la figure (3.9 (B)), la longueur finie des trajectoires introduit une variation de la mesure, lors des mesures de calibration, les trajectoires comportées

512 points pour se conformer à la longueur rencontrées lors des expériences in-vivo. De telles longueurs impliquent l'ajout d'une incertitude d'environ 10% à la mesure.

Si on additionne ces deux sources d'incertitudes, on retrouve bien les valeurs mesurées, ce qui nous permet de conclure que les expériences de suivi de particule unique sont aussi justes que possible.

3.2.5 Protocole d'acquisition et d'analyse

Après la phase de suivi de particule, réalisée avec l'algorithme MTT, les trajectoires sont analysées via un programme codé sous Matlab permettant de trier les particules immobiles, les différents type de diffusion, et enfin de calculer la viscosité des particules diffusant librement. Il permet aussi d'enregistrer les résultats de l'analyse (pour chaque particule) avec toutes les informations relatives à l'expérience, et ce dans un format standardisé. Les différents fichiers standardisés peuvent ensuite être concaténés dans une base de données centralisée, ce qui par la suite permet analyse et comparaison entre différentes population d'embryons selon n'importe quelle combinaison de paramètres enregistrée. À titre d'exemple, cela m'a permis de moyenniser la viscosité mesurée par chaque bille dans plus de 25 embryons différents pour les identifier comme diffusantes, ou encore de tracer la courbe de probabilité cumulative des viscosités mesurées dans tous les embryons sauvages et de la comparer à celle obtenue à partir des embryons drogués (Latrunculin A, cytoChalasin D...).

Ainsi, pour chaque bille de chaque embryon sont enregistrés :

- Trajectoire et position ;
- Déplacement carré moyen ;
- Type de diffusion (surdiffusion, diffusion ou sous-diffusion) et coefficient de Kuzumi ;
- Coefficient de diffusion ;
- viscosité apparente (quel que soit le type de diffusion, le tri peut s'effectuer en aval) ;
- Vitesse de dérive en cas de mouvement sur-diffusif.

Et pour chaque embryon on enregistre :

- Stade de développement et état de santé apparent ;
- Lignée génétique ;
- Information relative à l'injection : lieu, qualité ;
- Diamètre des billes injectées ainsi que leur concentration et leur éventuel revêtement chimique ;
- Drogue injectée dans l'embryon, concentration utilisée ;
- Paramètres d'analyse : tau (décalage temporel) maximum de calcul de la MSD, temps auxquels est calculé le coefficient de diffusion, taille de trajectoire minimale acceptée.
- Informations relatives aux conditions d'acquisition : temps d'exposition, temps d'acquisition, taille du pixel ;
- Adresse et nom de stockage des fichiers originaux pour les deux canaux (billes et marquage biologique).

Cette liste n'est pas exhaustive et des informations particulières peuvent être rajoutées par l'utilisateur, à sa discrétion.

3.3 Pince optique

La lumière, bien que sans masse, exerce une force sur toute chose. Cette force est très faible, et le premier phénomène macroscopique à avoir été remarqué est l'orientation de la queue des comètes, toujours orientées dans la direction opposée du soleil. L'impulsion transmise/transportée par un photon dans le vide est donnée par :

$$P_{\text{photon}} = \frac{h}{\lambda} \quad (3.21)$$

où h est la constante de Planck et λ la longueur d'onde du photon. Si ce photon transmet l'intégralité de son impulsion à un solide, celui-ci se verra appliquer une force de l'ordre de $6,6 \cdot 10^{-26}$ Newton, pour un photon de 1000 nm de longueur d'onde. On comprend alors que la réalisation de dispositif permettant de manipuler un objet grâce à la lumière nécessite de forte densité de lumière. Arthur Ashkin fut le premier à réaliser en 1970¹³ un tel dispositif en utilisant des sources laser. Plus tard¹⁴ il mit au point un autre dispositif permettant de piéger et manipuler un objet micrométrique à l'aide d'un seul faisceau focalisé.

3.3.1 Principe

Maintenir un objet à une position fixe dans le temps nécessite deux forces antagonistes. C'est de nouveau Arthur Ashkin qui introduisit la force dite *de gradient*, opposée à la force de pression. Elle fut dénommée ainsi car elle a pour origine le gradient d'intensité lumineuse. En utilisant un faisceau focalisé, on crée alors une variation de l'énergie perpendiculaire à la direction du faisceau. Pour des particules diélectriques d'indice de réfraction n_p supérieur à celui du milieu n_m , cette force est centripète et tend à ramener la particule au point d'intensité maximal i.e le point focal. Plus le gradient est fort plus la force sera importante, aussi on comprend qu'un piège optique requière un faisceau fortement focalisé et donc l'utilisation d'optiques à grande ouverture numérique.

Quelle que soit la taille de l'objet, un piège optique est toujours une position d'équilibre entre la force de radiation et celle de gradient. Elles trouvent leur origine dans l'interaction du champ électromagnétique de la lumière et la particule. Les interactions lumière-matière sont de trois types : la réflexion, la réfraction et la diffraction. Selon la taille de l'objet, leur contribution respective change drastiquement. Ainsi pour un objet grand devant la longueur d'onde ($r \gg \lambda$), la diffraction est négligeable et les phénomène de réfraction/réflexion dominant. Dans ce régime, il est possible d'établir un modèle basé

13. ASHKIN et DZIEDZIC 1971.

14. ASHKIN, DZIEDZIC et al. 1986.

sur l'optique géométrique. Dans le cas contraire d'un objet très petit ($r \ll \lambda$), la particule peut être considérée comme un dipôle induit (approximation dipolaire), car elle n'induit qu'une perturbation minimale du front d'onde. Pour une particule de taille comparable à la longueur d'onde ($r \simeq \lambda$), tous les types d'interactions lumière-matière doivent être pris en compte (faisceau gaussien, forme de la particule...) et le calcul devient très complexe.

Approximation dipolaire ou régime de Rayleigh ($r \ll \lambda$).

Dans ce régime, la particule est suffisamment petite pour être considérée comme un dipôle induit dans un champ électromagnétique instantané constant. La particule acquiert donc un moment dipolaire \vec{p} :

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad (3.22)$$

avec \vec{E} le champ électrique et α la polarisabilité de la particule. Pour une sphère diélectrique et transparente de rayon a , α s'écrit :

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 n_m^2 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (3.23)$$

où ϵ_0 est la permittivité diélectrique du vide, n_m l'indice de réfraction du milieu, et m le rapport entre l'indice de réfraction de la particule n_p et celui du milieu. De l'interaction entre le dipôle et le champ du faisceau incident, naissent deux forces :

- **Force de radiation ("scattering force")**. Comme le champ du faisceau oscille harmoniquement, le dipôle acquiert un moment dipolaire et agit comme une antenne, ré-émettant des ondes dans toutes les directions. Apparaît donc par superposition des deux champs une modification du flux d'énergie du système entraînant un changement de la quantité de mouvement. La force de pression radiative s'écrit alors¹⁵ :

$$\vec{F}_{rad}(\vec{r}) = \frac{128}{3} \frac{\pi^5 a^6 n_m}{\lambda^4 c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) I(\vec{r}) \vec{u} \quad (3.24)$$

où $I(\vec{r})$ est la distribution d'intensité du faisceau, m le rapport entre les indices de réfraction de la particule et du milieu n_p/n_m , et \vec{u} le vecteur unitaire dirigé suivant l'axe optique du faisceau incident.

- **Force de Lorentz**. La force de Lorentz agit sur le dipôle induit et possède deux composantes : l'une radiale tend à ramener ou à éloigner la particule au centre du faisceau, et l'autre, axiale, s'oppose à la force radiative :

$$\vec{F}_{grad}(\vec{r}) = \frac{2\pi n_m^2 a^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I(\vec{r}) \quad (3.25)$$

15. HARADA et ASAKURA 1996.

Comme on peut le voir, cette force dépend du gradient d'intensité, d'où son nom de force de gradient.

Bien que non-valide pour une particule de $1 \mu\text{m}$, ce modèle nous renseigne sur la dépendance de la force aux différents paramètres du système¹⁶. On apprend ainsi que la direction de la force de gradient dépend du rapport d'indice m . Si $n_p > n_m$, la particule est attirée par le point de plus grande intensité (point focal). Dans le cas contraire, la particule s'éloigne du point focal. Au contraire de la force de gradient, la force radiative est non-conservative : elle pousse la bille dans la direction du faisceau incident (\vec{u}). Aussi, pour obtenir un piège, i.e un minimum local d'énergie, il faut $F_{grad} \cdot \vec{u} > F_{rad}$. Cela implique aussi que, pour obtenir un piège fort, il faut minimiser F_{rad} et maximiser F_{grad} . Quand F_{rad} dépend de l'intensité, F_{grad} dépend de son gradient, aussi à puissance égale il est important d'obtenir le gradient le plus pentu possible. Pour cela nous utilisons un faisceau gaussien (qui présente naturellement une forte variation d'intensité) que l'on focalise le plus possible, via un optique à grande ouverture numérique (ON). Puisque plus l'ON est importante, plus le waist (largeur de la taille de diffraction au plan focal) du faisceau gaussien est petit :

$$\omega_0 = \frac{1.22\lambda}{2ON} \quad (3.26)$$

où ω_0 est le waist, λ est la longueur d'onde et ON l'ouverture numérique de l'objectif. Un autre moyen de minimiser F_{rad} consiste à utiliser un faisceau de grande longueur d'onde puisque celle-ci diminue en λ^4 .

Modèle basé sur l'optique géométrique ($r \gg \lambda$).

Pour des objets plus grands que λ , les phénomènes de réflexion/réfraction dominant. On peut alors expliquer le principe de la pince optique à partir des lois de l'optique géométrique.

Chaque faisceau est caractérisé par une impulsion (**eq 3.21**), en partie transférée à la sphère lors de leur interaction. Lorsque le faisceau est réfléchi (**fig3.14, A**), on parle de collision élastique et la quantité de mouvement transmise est fonction de l'angle d'incidence. Comme une boule de billard sur laquelle on soufflerait, la sphère est "poussée" par la lumière incidente (**figure 3.14, A**).

Lors de la réfraction d'un faisceau, il y a transfert d'une impulsion Δp :

$$\vec{\Delta p} = \vec{p}_i - \vec{p}_f \quad (3.27)$$

où \vec{p}_i est l'impulsion incidente et \vec{p}_f l'impulsion sortante de la sphère. Si l'illumination est homogène et colimatée, la somme des vecteurs produit une force dirigée dans le sens de propagation du faisceau, contribuant à la force radiative. Pour un faisceau présentant un

16. SVOBODA et BLOCK 1994.

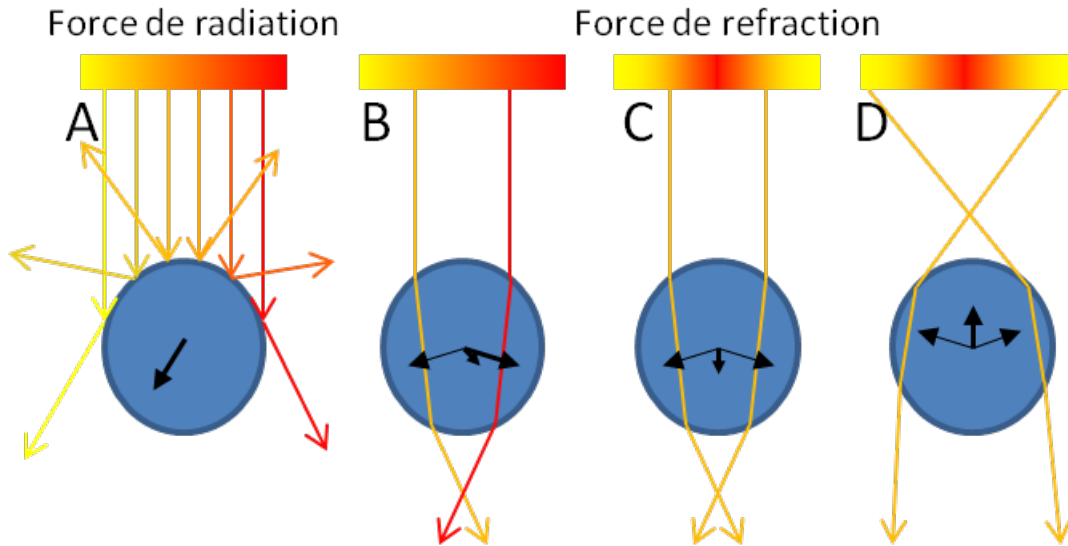


FIGURE 3.14 – Forces exercées par la lumière sur une sphère diélectrique transparente. (A) force due à la réflexion; (B,C) force due à la réfraction d'un faisceau colimaté pour différents profils d'intensité; (D) pour un faisceau gaussien focalisé.

gradient d'intensité, la somme des impulsions tend à ramener la particule vers le maximum d'intensité (si $m > 1$) mais la pousse toujours (fig3.14, B). Pour contrer la force radiative, il est nécessaire de focaliser le faisceau (fig3.14, D). Une position d'équilibre est alors créée : le gradient du faisceau tend à centrer la bille tandis que sa focalisation "l'aspire" et s'équilibre à la force radiative.

Théorie généralisée de Lorentz-Mie ($r \simeq \lambda$)

Pour une taille de particule similaire à la longueur d'onde (régime intermédiaire), la théorie généralisée de Lorentz-Mie propose une solution rigoureuse. Proposé par Gouesbet *et al*¹⁷ comme une généralisation de la théorie de diffraction d'une onde plane sur une particule sphérique de Lorentz-Mie, elle permet de calculer les forces optiques résultant de l'interaction entre une sphère et un faisceau gaussien quelle que soit l'échelle. Ce calcul requiert l'utilisation d'intégrales numériques, gourmandes en temps de calcul; aussi son utilisation pratique est limitée. Afin d'en faciliter l'utilisation pour la conception de piège optique, Nahmias et Odde¹⁸ ont établi des abaques permettant l'estimation des forces de piégeage pour des sphères diélectriques et transparentes. Ils proposent deux paramètres sans dimension pour lesquels ils ont remarqué une corrélation avec les forces prédites par la théorie.

17. GOUESBET, MAHEU et GREHAN 1988.

18. NAHMIA et ODDE 2002.

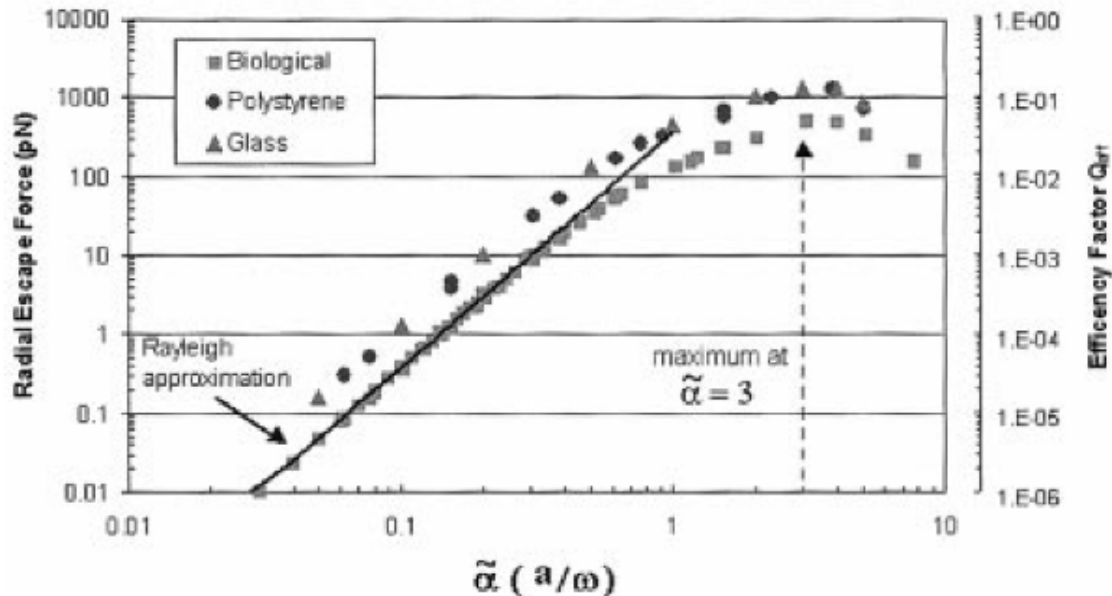


FIGURE 3.15 – Evolution de la force latérale d’un piège en fonction du paramètre $\tilde{\alpha}$ pour un faisceau de 100 mWatt. Graphique de Nahmias et Odde²⁰

Le paramètre sans dimension α :

$$\tilde{\alpha} = r/\omega_0 \quad (3.28)$$

où r est le rayon de la sphère et ω_0 le rayon du faisceau, permet d’estimer sur un abaque la force radiale de piégeage (force de rappel perpendiculaire à l’axe optique).

Pour une sphère de polystyrène ($n_{\text{sphère}} = 1,59$) de 500 nm de diamètre illuminée par un faisceau laser de 1070nm focalisé par un objectif d’ouverture numérique de 1,49, $\alpha \simeq 0,6$. Aussi, on peut estimer à partir de l’abaque une force maximale d’environ 100pN pour un Watt. Au cours de mes expériences, la puissance laser maximum utilisée est de 300mW au niveau de la bille. Aussi, en assumant une dépendance linéaire²¹ de la force à la puissance du laser, j’estime une force maximale d’environ 30pN.

3.3.2 Photo-toxicité et échauffement local

Un piège optique nécessite un flux important de photons sur une petite surface. Pour un faisceau de un watt focalisé avec une ouverture numérique de 1.49, la densité surfacique de puissance est de $0,5MW.cm^{-2}$. En comparaison, la densité surfacique de puissance d’une journée ensoleillée est de $100mW.cm^{-2}$. Il est donc raisonnable de s’interroger sur les conséquences d’un tel flux de lumière sur un organisme vivant.

21. NEUMAN et BLOCK 2004.

Le laser utilisé pour le piégeage optique émet à 1070 nm de manière continue. Cette longueur d'onde correspond à un minimum d'absorption d'un tissu biologique (**figure 3.16**). Pour un laser continu, différentes études montrent que le piège entraîne un échauffement local de quelques dizaines de degrés par watt²². À moyen terme (>200s) Neuman *et al* suggèrent un effet métabolique impliquant une absorption à 1 photon et des molécules d'oxygène²³. Au cours de mes manipulations, les puissances impliquées sont environ 3 fois supérieures à celles utilisées dans cette dernière étude ; cependant, la durée moyenne d'une expérience au sein d'une cellule est de 10 secondes. Aussi, je n'ai jamais observé de dommages qui auraient pu être infligés par la pince. Même longtemps après la manipulation (15-30min), aucune blessures, apoptose ou signe visible de dommage n'a été observé. D'autre part, je n'ai pas connaissance de phénomènes photochimiques donnant lieu à une quelconque modification du cytosquelette ou des propriétés mécaniques d'une cellule.

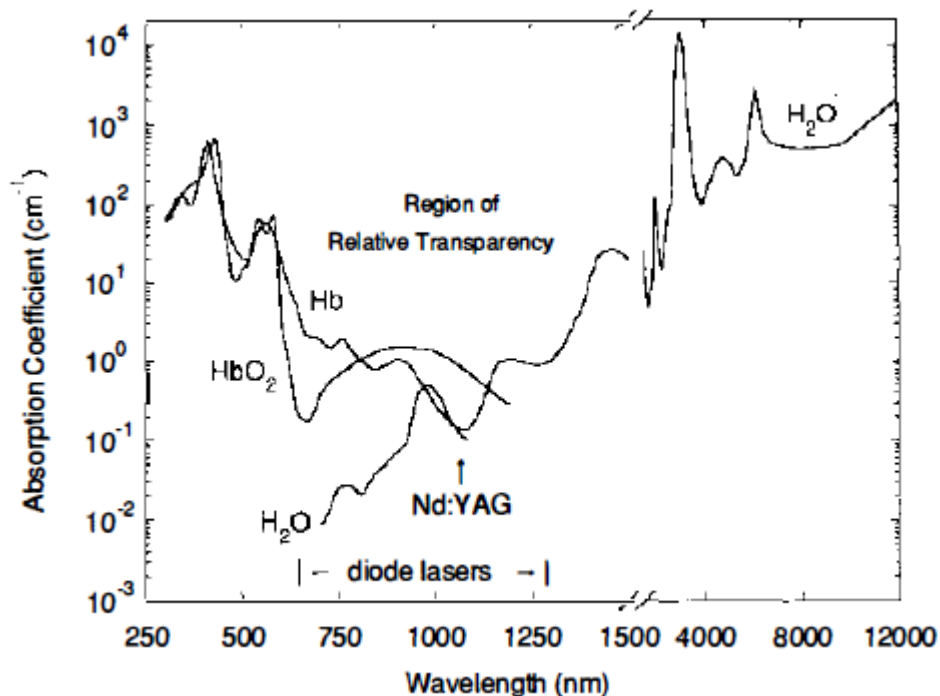


FIGURE 3.16 – Absorption optique de l'eau, de l'hémoglobine oxygénée et non oxygénée, respectivement HbO_2 et Hb ²⁵.

Plus récemment, Perterman *et al*²⁶ ont étudié plus en détails l'échauffement local du au piège. Ils ont ainsi pu mesurer que, dans l'eau, un laser de 1064 nm entraîne un

22. LIU *et al.* 1995.

23. NEUMAN, CHADD *et al.* 1999.

26. PETERMAN, GITTES *et al.* SCHMIDT 2003.

échauffement local de $7,7K.W^{-1}$. Ils ont aussi montré que la bille n'a que peu d'effets sur l'échauffement. D'après cette étude, on peut estimer que pour un faisceau de 400 mW (puissance maximale utilisée au cours de mes expériences), l'échauffement est d'environ 3K.

3.3.3 Détecteur de position

Pour des déplacements de faible amplitude devant la tache de focalisation du faisceau, les pinces optiques se comportent comme un ressort :

$$F_{\text{piège}} = k_{\text{piège}}d \quad (3.29)$$

où $F_{\text{piège}}$ est la force exercée par le piège sur la particule, $k_{\text{piège}}$ la rigidité du piège et d la distance entre le centre du piège et la particule. Comme les déplacements sont petits devant la limite de diffraction, il est très difficile de les mesurer avec précision sur une séquence d'images, d'autant plus que sur la grande majorité des montages, le laser de piégeage est filtré pour ne pas endommager la caméra, aussi il n'est même pas sur l'image. D'autre part, les caméras ne permettent que très rarement d'atteindre des vitesses d'acquisition importante. Cette mesure est donc effectuée par un détecteur de position (diode PIN ou photo-diode à quatre quadrants) qui permet selon le détecteur de réaliser entre 9000 et 100000 mesures par seconde avec une précision de localisation de l'ordre du nanomètre²⁷.

Dans la majorité des montages, le détecteur (PSD, pour *position sensitive detector*) est placé en aval de l'échantillon et mesure la déflexion du faisceau par la bille. Seulement, dans un embryon, le libre parcours moyen d'un photon à 1180 nm est de $90 \mu m$ ²⁸. Ainsi, pour un embryon de $200 \mu m$ d'épaisseur, on considère que seul un dixième des photons l'ont traversé sans diffuser. On comprend donc pourquoi il est difficilement envisageable d'utiliser un PSD en aval²⁹. Dans certains montages³⁰, le PSD est placé en amont de l'échantillon et mesure les fluctuations du faisceau réfléchi sur la bille. Cette géométrie est peu utilisée car il a été reporté que le régime de détection linéaire est inférieur à celui que l'on obtient avec une détection en aval. Notons, de plus, que pour limiter la force de radiation et l'échauffement du milieu, on utilise des particules transparentes.

J'ai donc essayé d'utiliser un détecteur de position en amont de l'échantillon comme illustré en **figure (3.17)**. Pour maximiser la quantité de lumière réfléchie par l'échantillon j'ai placé la photo-diode à quatre quadrants en sortie d'une diode optique. La lumière

27. NEUMAN et BLOCK 2004.

28. DÉBARRE et al. 2004.

29. LEIDEL et al. 2012.

30. HUISSTEDE et al. 2005.

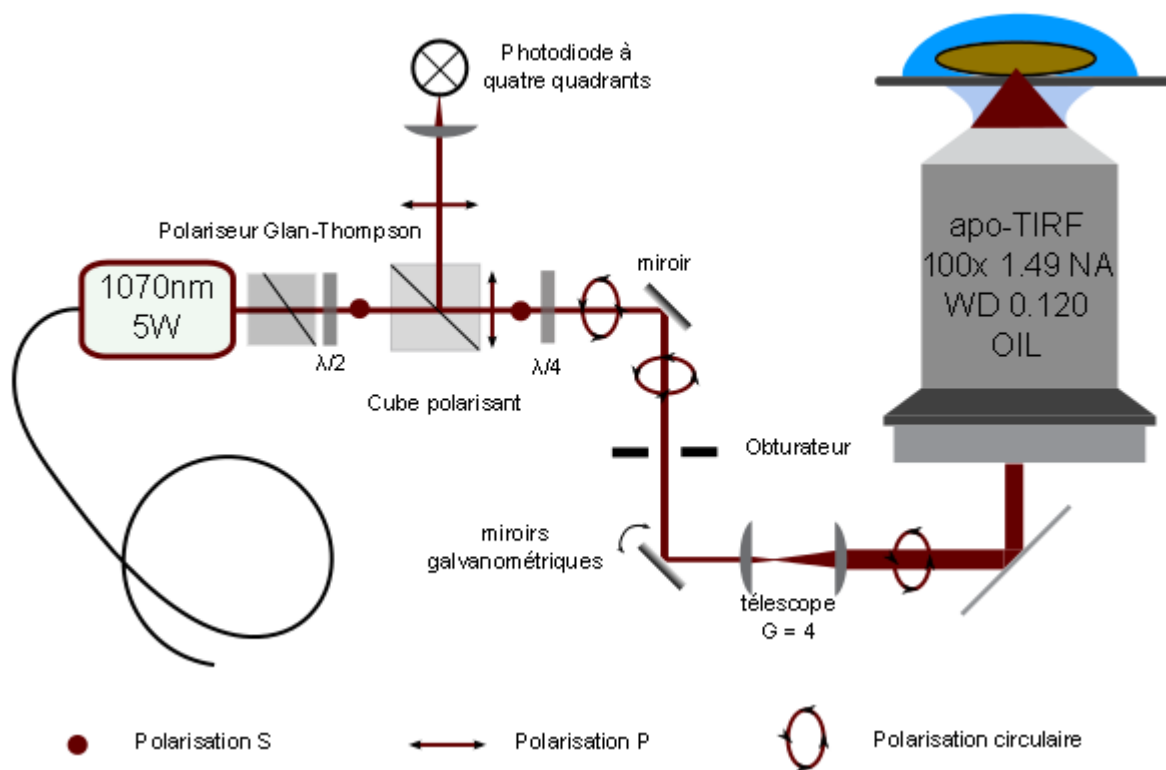


FIGURE 3.17 – Schéma du montage optique réalisé pour utiliser un PSD.

émise par le laser est polarisée par un prisme de Glan-Thompson ensuite, une lame demi onde ajuste son orientation en une polarisation S pour que la lumière soit transmise par le cube séparateur de polarisation. Une lame quart d'onde transforme la polarisation linéaire en une polarisation circulaire. La lumière réfléchiée par la bille retransverse alors la lame quart d'onde pour se voir retransformée en une polarisation linéaire de type P, si bien qu'elle est réfléchiée par le cube séparateur de polarisation, avant d'atteindre le PSD.

Problèmes rencontrés

Pour des petits déplacements de la bille par rapport au centre du faisceau (donc du piège), le signal du PSD devrait être un voltage proportionnel au déplacement : régime linéaire de détection³¹. Pour tester ce régime et calibrer le signal du PSD, j'ai effectué quelques manipulations simples. J'ai déplacé une bille à vitesse constante dans l'eau. Le déplacement est une oscillation en dents de scie, afin que la manipulation s'effectue toujours au centre du champ de vu. Les résultats d'une de ces expériences sont montrés en figure (3.18).

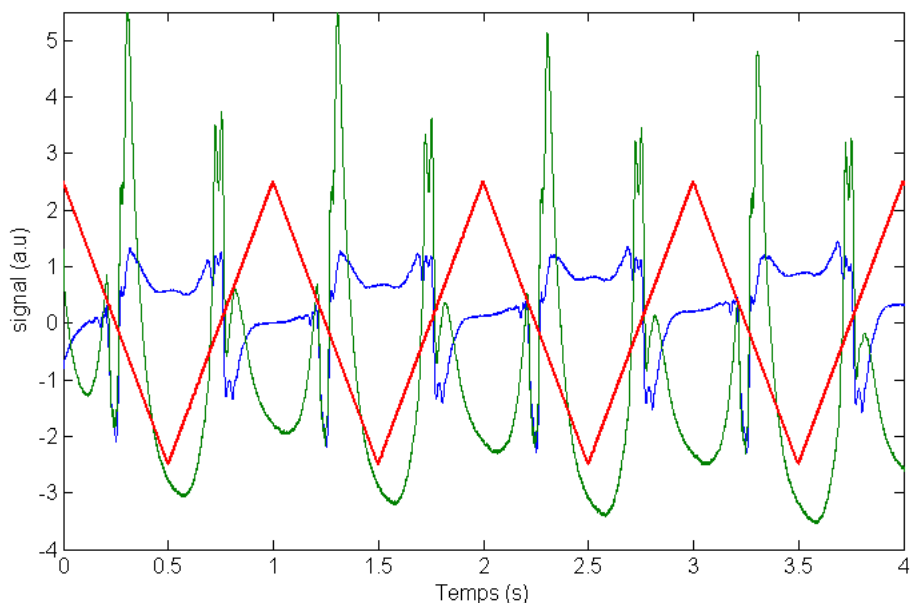


FIGURE 3.18 – Courbe rouge : mouvement du piège. Courbe bleue et verte : Signal mesuré par la photo-diode à quatre quadrants respectivement en X et Y.

Si on considère que la bille reste dans le régime linéaire du piège, le signal enregistré

31. HUISSTEDE et al. 2005.

par le PSD devrait ressembler à un créneau³². L'eau est un milieu visqueux, et comme on l'a vu en **figure (3.18)**, à ces échelles l'inertie est négligeable. Aussi, deux forces égales s'exercent sur la bille : la force du piège et la force de traînée, proportionnelle à la vitesse de déplacement et au coefficient de traînée. Pour une bille de $2\mu\text{m}$ de diamètre se déplaçant avec une vitesse de $12\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans de l'eau, la force de traînée devrait être de 0.1pN . Comme la vitesse de déplacement est constante, la force du piège l'est aussi ainsi que la distance bille-piège. C'est pourquoi on devrait observer un signal constant pour chaque demi-période de déplacement.

Comme peut le voir sur la **figure (3.18)**, ce que mesure la photodiode à quatre quadrants ne ressemble en rien à la courbe créneau attendue. Plusieurs problèmes se posent :

- Si on peut distinguer sur les courbes vertes et bleu deux motifs qui se répètent, leur transition ne se produit pas lorsque le laser change de sens (pointe de la courbe rouge) mais au milieu de la trajectoire ;
- Pour les courbes (verte et bleu) on observe une réponse qualitativement différente entre les allers et les retours.
- bien que le mouvement du piège se fasse selon un ligne, un signal est mesuré dans deux directions orthogonales. Il semble que le signal n'ait pas de base orthogonale propre : j'ai réalisé cette expérience pour des droites ayant un angle de 0 à π et pour aucune orientation, je n'ai observé une extinction du signal sur l'un des deux voies.

Nous interprétons ce phénomène non linéaire comme la résultante d'un processus d'interférence entre les ondes polarisées incidentes et réfléchies qui ont une structure complexe. Aussi, nous n'avons pas utilisé de PSD pour les expériences de pinces optiques. Par conséquent, toutes les données sont extraites des images et comme le laser n'est pas visible des caméras, toutes les analyses ultérieures ont été réalisées sans mesure directe de la distance bille-laser. Celle-ci peut ensuite être déterminée à partir de l'image de la bille et de la consigne de position imposée au laser.

3.3.4 Calibration de la pince optique

Malgré l'absence de détecteur de position, nous avons calibré la rigidité du piège dans l'embryon.

Sans PSD, la méthode d'ajustement du spectre de puissance des fluctuations thermiques de la bille dans le piège par une Lorentzienne³³, n'est pas réalisable. Elle requiert en effet un taux d'échantillonnage trop élevé pour les caméras utilisées ($>50\text{kHz}$). Les méthodes où la bille est soumise à un flux laminaire constant (donc à une force de traînée

32. SIMMONS et al. 1996.

33. NEUMAN et BLOCK 2004.

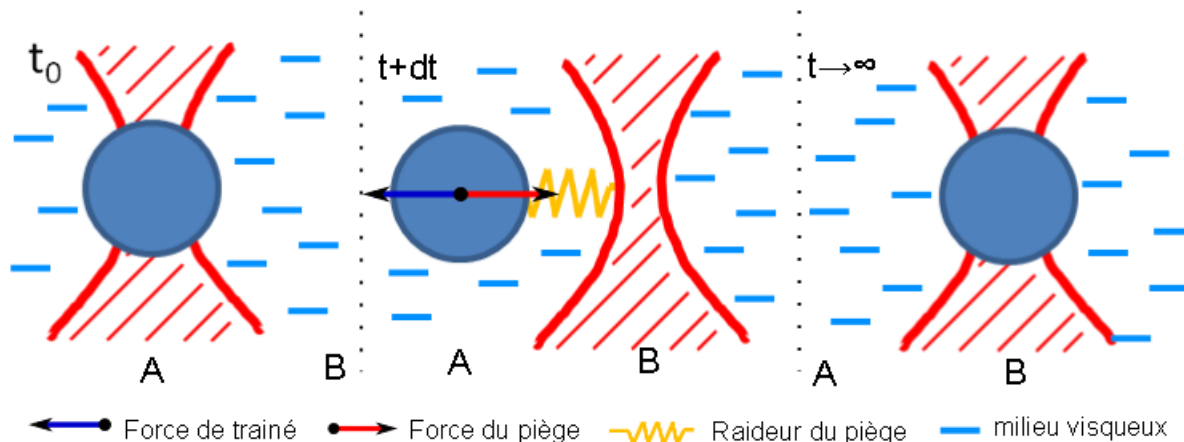


FIGURE 3.19 – Schéma de l'expérience de calibration du piège optique

constante), ne sont pas applicables in-vivo.

J'ai donc opté pour une méthode de calibration où la bille oscille entre deux positions très proches l'une de l'autre. Pour cela, le laser suit un mouvement périodique en créneau et passe instantanément d'une position A à une position B proche (**figure 3.19**). L'amplitude du créneau doit être suffisamment petite pour que la bille reste à portée du piège. Si le milieu est visqueux, seule la force de traînée s'oppose au mouvement de la bille, et on peut physiquement formaliser le problème comme un problème de relaxation d'une bille attachée à un ressort dans un milieu visqueux. La trajectoire de cette dernière au cours du temps est donc donnée par :

$$x(t) = A(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad \text{avec} \quad \frac{1}{\tau} = \frac{k_{\text{piège}}}{\gamma} \quad (3.30)$$

où x est la position de la bille, A l'amplitude de déplacement du laser, τ la constante de relaxation qui n'est autre que le rapport de γ (le coefficient de traînée de la bille dans un milieu visqueux) sur $k_{\text{piège}}$ (la rigidité du piège). Comme on peut le voir dans cette équation, pour mesurer la rigidité, il convient de connaître préalablement la viscosité du milieu. Aussi, je me suis appuyé sur les mesures de viscosités réalisées par suivi de particule unique et présentées en **section (??)**. Pour des particules de 500 nm de diamètre, j'ai mesuré une viscosité moyenne de $0.9 \pm 0.3 Pa.s$, la moyenne étant obtenue pour $N = 50$ billes dans plusieurs embryons durant l'élongation de la bandelette germinale.

Cette méthode présente plusieurs avantages. Il n'est pas nécessaire de connaître précisément la position du laser, celle ci nous est donnée par les positions d'équilibre après relaxation de la bille. Plus le milieu est visqueux, plus la relaxation est longue, et donc plus une caméra est apte à échantillonner correctement les différentes positions de la bille. Comme il s'agit d'une oscillation périodique, la mesure est répétée plusieurs fois. Le déplacement se fait dans les deux sens, ce qui permet de mesurer la symétrie du piège selon une direction. Et enfin, puisqu'elle ne requiert que de petits déplacements ($< 1 \mu m$), elle est tout à fait adaptée à l'environnement intracellulaire.

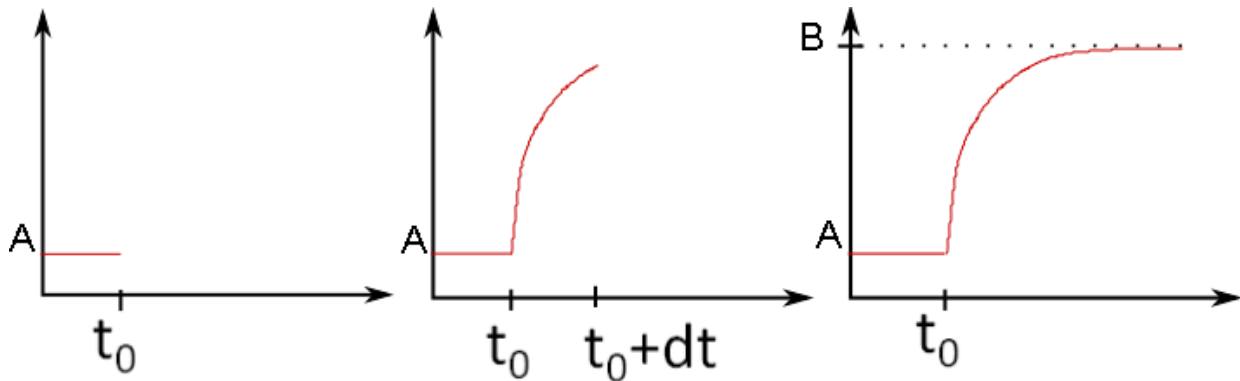


FIGURE 3.20 – Trajectoire de la bille en réaction au déplacement instantané et de faible amplitude du piège optique.

Le déplacement de la bille étant unidimensionnel, il suffit pour obtenir la trajectoire de réaliser un kymographe du mouvement et, pour chaque pas, d'ajuster au profil d'intensité mesuré (**figure 3.21 B**) une gaussienne. Enfin, le temps de relaxation est déterminé par ajustement de fonction (**eq 3.30**).

J'ai réalisé cette expérience sur quatre billes, dans quatre embryons différents, à des stades de développement identiques, avec une puissance au point de focalisation de 350mW. Les résultats pour chaque bille sont résumés dans le tableau (**tableau 3.22**). Si on normalise les raideurs mesurées par la puissance du laser, on trouve des valeurs moyennes situées de $250 \pm 120 pN \cdot \mu m^{-1} \cdot W^{-1}$ et $500 \pm 190 pN \cdot \mu m^{-1} \cdot W^{-1}$ ce qui est en accord avec les valeurs rapportées par d'autres équipes³⁴. On obtient deux valeurs moyennes statistiquement différentes entre les deux côtés du laser. J'attribue cette différence de raideur à une asymétrie de la fonction d'étalement du point (PSF) du faisceau laser, et donc de la répartition de l'énergie. On peut aussi remarquer que l'écart-type des mesures est d'environ 50%, valeur que l'on peut en partie attribuer à la diversité d'environnement mécanique de l'embryon, telle qu'illustrée par la diversité des viscosités mesurées. Il est également probable que le taux d'acquisition (200 Hz) ne soit pas suffisant. En effet, même dans un environnement aussi visqueux que l'embryon, le temps moyen de relaxation (τ) est de 50 ms. Autrement dit, l'algorithme d'ajustement ne dispose que d'une demi-douzaine de points pour ajuster la plus grande partie de la relaxation.

D'autre part, un problème d'ordre matériel, que nous n'avons résolu que récemment (mars 2013), nous a empêchés de réaliser davantage de mesures : selon différents angles et à différentes puissances.

34. SIMMONS et al. 1996.

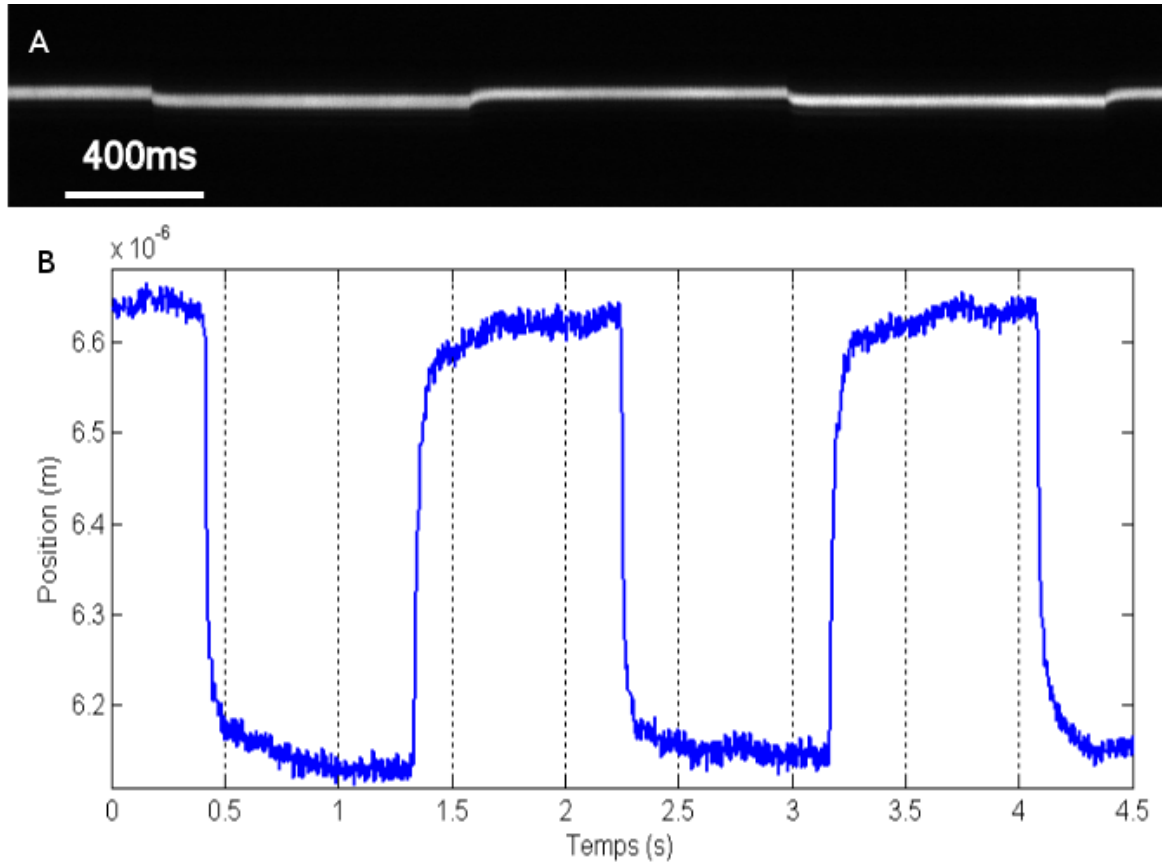


FIGURE 3.21 – A : kymographe d’une bille relaxant entre deux positions. B : super-localisation de la bille

	Raideur du piège ($pN \cdot \mu m^{-1}$)	
	Gauche	Droite
Embryon 1 (n = 4-3)	60 ± 20	108 ± 50
Embryon 2 (n = 4-3)	50 ± 13	107 ± 46
Embryon 3 (n = 6-6)	112 ± 42	176 ± 46
Embryon 4 (n = 5-6)	131 ± 16	226 ± 54
Tous (n = 19-18)	92 ± 43	170 ± 67

FIGURE 3.22 – Raideurs de la pince optique mesurées in-vivo. Les mesures sont réalisées pour chaque coté du piège. Les résultats pour chaque embryon sont la moyenne des n relaxations, respectivement gauche et droite.

3.3.5 Pince optique : bilan

Dans cette partie, je viens de présenter le montage et la caractérisation de la pince optique permettant de manipuler des billes de polystyrène de 500 nm de diamètre dans un embryon de drosophile vivant. Le principal obstacle rencontré a été l'impossibilité d'utiliser un détecteur de position, et donc de réaliser des mesures de forces directes ainsi que des mesures de micro-rhéologie classiques. Pour pallier à ce défaut, j'ai développé des protocoles de manipulation (bélier optique) et d'analyse originaux afin de pouvoir sonder les propriétés mécaniques des jonctions.

Troisième partie
Résultats et discussion

Chapitre 4

Suivi de Particules

4.1 Paramètres Généraux d'acquisition

Dans les sections suivantes, je vais présenter les résultats obtenus avec les expériences de suivi de particules menées dans l'embryon de drosophile. Toutes les expériences suivantes ont été réalisées avec les mêmes paramètres d'acquisition : 512-1024 images des billes sont capturées avec un temps d'exposition de 26 ms et un taux de répétition de 38 Hz donnant lieu une durée totale de 13 à 26 secondes. Parallèlement, la seconde caméra enregistre une dizaine d'images des jonctions adhérentes marquées par la E-Cad : :GFP. Ces images sont ensuite moyennées afin d'obtenir une image statique de l'environnement biologique sur laquelle on superpose les trajectoires des billes.

À partir des trajectoires obtenues, on calcule le déplacement carré moyen de chaque particule pour un décalage temporel de 10 pas soit $\tau_{max} = 260\text{ms}$. La pente de la MSD est mesurée entre le premier point (un pas de décalage) et le quatrième (quatre pas de décalage); autrement dit, le coefficient de diffusion et la viscosité sont calculés sur une durée de $3 * 26 = 78\text{ms}$.

Les solutions de billes injectées sont diluées 500 fois dans de l'eau (solvant) par rapport à la solution mère à 2% solide. Deux tailles de billes différentes ont été utilisées dans différentes solutions pour réaliser des mesures de suivi de particules uniques. Les différentes solutions utilisées sont résumées dans le **tableau (4.1)**. Les mesures avec les billes de 500nm ont été réalisées pour obtenir une mesure de la viscosité intracellulaire, qui est ensuite utilisée pour la mesure de rigidité des tensions détaillée dans la **section (5.1)** et sont donc moins nombreuses que celles réalisées avec des billes de 100 nm.

Nous avons effectué des mesures dans des embryons sauvages (Wild type : WT) injectés avec une solution aqueuse contenant des billes et des embryons injectés de surcroît par certaines drogues : la latrunculine A, la cytochalasins D ainsi que des ARN interférents.

La latrunculin A (Lat A)est une toxine qui se lie de manière permanente aux monomères d'actine; ainsi, par effet de séquestration, les filaments d'actine ne sont plus réapprovisionnés et finissent par disparaître. En revanche, les filaments stables, qui ne se

Solution	Φ	
	100 (nm)	500 (nm)
Solvant pur	oui	oui
Latrunculin (5nM) A	✓	✓
Cytochalasin D (5nM)	✗	✓
jBug RNAi (5 μ M)	✗	✓
jBug RNAi (1 μ M)	✗	✓

FIGURE 4.1 – Différentes solutions injectées dans les embryons

dépolymérisent pas, ne sont pas atteints ; toutes les structures ne sont donc pas détruites. La cytochalasin D (CytoD) sépare les monomères d'actine des filaments et séquestre ceux qui sont en solution. Ces deux drogues ont été utilisées pour étudier le rôle du cytosquelette d'actine sur les propriétés mesurées. Des deux drogues, la cytochalasin D a l'effet le plus important, car tous les filaments sont affectés.

Jbug RNAi est un ARN interférent (ARNi) d'un isoforme de la filamine. Il s'agit de séquences d'ARN (509 bases) complémentaires qui vont se lier à certains endroits de l'ARN codant la protéine, empêchant sa traduction et causant sa dégradation prématurée. La filamine étant un élément liant du cytosquelette (cross-linker), on étudie ainsi l'effet d'un changement de composition de celui-ci sur les mesures de rigidité des membranes (**cf partie (5.1)**) et de viscosité. Ces expériences ont été réalisées avec Akanshi Munjal qui a, dans le cadre de sa thèse, produit l'ARNi et réalisé les pré-injections. Pour ces expériences, les embryons ont subi deux injections successives : la première d'ARNi concentré à 1 ou 5 μ M, 20 min après la ponte, et la seconde d'une solution de billes diluées dans de l'eau, durant la cellularisation.

4.2 Différents types de mouvement

Une fois les MSD calculées, la première étape de l'analyse consiste à catégoriser les différents types de diffusions à l'aide du test de Kuzumi (3.2.3). Les résultats sont résumés dans les tableaux (4.2) et (4.3).

Billes de 100 nm de diamètre

	Diffusion (%)	Sur-diffusion (%)	Sous-diffusion (%)	N_{Billes}	$N_{Embryons}$
WT	29	70.5	0.5	4650	26
Lat A (5nM)	38.5	60.5	1	6173	21

FIGURE 4.2 – Population des différents types de diffusion dans des embryons sauvage, et avec Latrunculin D de concentration 1 nM

Comme on peut le constater, quasiment aucune bille (<1%) n'est catégorisée en régime de sous-diffusion dans les deux populations. Les deux populations d'embryons présentent

plus de 60% de billes considérées comme dérivantes. La vitesse moyenne de dérive est de $60 \pm 30 \text{ nm.s}^{-1}$ pour les embryons sauvages, et de $70 \pm 30 \text{ nm.s}^{-1}$ pour les embryons dans lesquels on a injecté de la latrunculine A. Le reste des billes est considéré comme diffusant.

Billes de 500 nm de diamètre

	Diffusion (%)	Sur-diffusion (%)	Sous-diffusion (%)	N_{Billes}	$N_{Embryons}$
WT	0	100	0	119	2
Lat A (5nM)	33	67	0	41	1
Cyto D (5nM)	27	66	7	27	2
jBug ($5\mu M$)	34	63	1	55	1
jBug ($1\mu M$)	30	68	2	93	6

FIGURE 4.3 – Billes de 500nm : pourcentage de billes par type de mouvements.

À la différence des billes de 100nm, les billes de 500 nm présentent toutes un comportement sur-diffusif de vitesse moyenne $90 \pm 30 \text{ nm.s}^{-1}$. En revanche, on retrouve la même répartition des régimes dès lors que l'on se trouve dans un embryon perturbé (injection de drogue). Pour les différents phénotypes, les vitesses de dérive sont résumées dans le tableau suivant :

	Vitesse moyenne (nm.s^{-1})	Écart-type (nm.s^{-1})	N_{Billes}
WT	90	30	119
Lat A (5nM)	160	90	27
Cyto D (5nM)	210	100	18
jBug ($5\mu M$)	190	100	34
jBug ($1\mu M$)	150	130	63

FIGURE 4.4 – Billes de 500nm : pourcentage de billes par type de mouvements.

4.3 Mesures de viscosités

Une fois les différents types de diffusion catégorisés, on calcule pour chaque MSD la viscosité associée à l'aide de la relation de Stokes-Einstein (**eq 3.6**). Bien sûr, cette relation n'est valable que pour les billes diffusant librement. La viscosité retournée pour les billes sur-diffusantes est sous-estimée. Aussi, sauf mention explicite, les valeurs de viscosités discutées dans ce manuscrit proviennent toutes de particules diffusant librement. Les tableaux suivants ((4.5) et (4.7)) résument les viscosités mesurées dans les différents groupes d'embryons.

	$\langle \eta \rangle$ (Pa.s)	écart-type (Pa.s)	Erreur Standart	N_{Billes}
WT	3.6	3.6	0.1	1350
Lat A (5nM)	2.8	3.2	0.07	2410

FIGURE 4.5 – Viscosités mesurées par les billes de 100 nm.

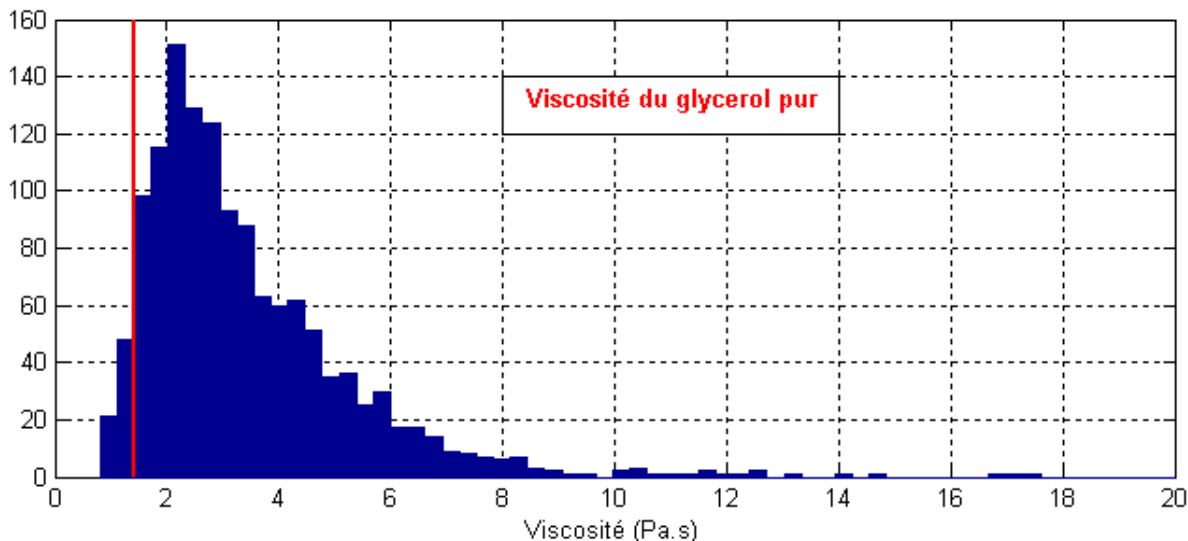


FIGURE 4.6 – Histogramme des viscosités mesurées dans les embryons WT

Billes de 100 nm de diamètre

On constate que les particules diffusant librement au sein des cellules ressentent une très forte viscosité quel que soit le phénotype. Par comparaison, la viscosité du glycérol pur est de 1.5 Pa.s. Mais les écart-types mesurés indiquent aussi une très grande variété d'environnements mécaniques. L'endommagement du cyto-squelette causé par la latrunculine A induit une légère baisse de la viscosité moyenne, ce qui semble indiquer que le réseau d'actine est sondé par une partie des particules injectées.

Billes de 500 nm de diamètre

	$\langle \eta \rangle$ (Pa.s)	Écart-type (Pa.s)	Erreur Standart	N_{Billes}
WT	0.8*	0.4*	0.036*	109*
Lat A (5nM)	0.14	0.18	0.04	14
Cyto D (5nM)	0.06	0.05	0.02	7
jBug (5 μ M)	0.09	0.15	0.03	18
jBug (1 μ M)	0.09	0.06	0.01	27

FIGURE 4.7 – Viscosités mesurées par les billes de 500 nm. Les mesures marquées d'un astérisque ont été obtenues après correction de la vitesse de dérive.

Les embryons sauvages ne présentant pas de particules diffusant librement, la valeur

présentée ici à été obtenue par correction de la dérive. La validité de cette approche fait l'objet d'une discussion en **section (4.4)**. On remarque que le tissu est moins visqueux pour les particules de 500nm, et aussi mécaniquement homogène. Pour les embryons non sauvages, on constate une diminution drastique de la viscosité, écart type inclus. Ce qui laisse supposer que les mesures réalisées avec ces billes sont plus sensibles à l'état du cyto-squelette que les 100 nm.

4.4 Discussion

Particules de 100 nm

Ne pas trouver de particules dans le régime sous-diffusif est sans doute le résultat le plus marquant des expériences de suivi de particules. Car cela implique qu'aux échelles de temps et de tailles étudiées, les cellules du tissu sont purement visqueuses. Daniels *et al*¹ rapportent aussi ne pas avoir trouvé d'élasticité mesurable à 1 seconde pour des billes de mêmes tailles dans l'embryon de *C.elegans* (stade uni et bi-cellulaire). Ils expliquent cette absence par la différence de localisation des particules et du cytosquelette. En effet, à ce stade du développement, l'actine est concentré dans le cortex des cellules. En revanche, les deux études diffèrent en deux points : dans la drosophile, une très grande diversité de viscosité est mesurée, 100% en pourcentage de la valeur moyenne contre 10% chez *C.elegans*, ensuite, ils ne commencent à observer des mouvements dirigés qu'à des temps supérieurs à 1 seconde. Aussi, la cellule de drosophile présenterait une plus grande hétérogénéité mécanique que l'embryon de *c.elegans*. Notons que contrairement à eux, nous n'avons pas utilisé de billes revêtues de PEG et nous ne pouvons pas exclure que des interactions spécifiques ne perturbent les mesures de viscosité. Contrairement à *C.elegans* au stade uni et bi-cellulaire, les cellules que nous étudions sont fortement polarisées (épithélium) que celles de *C.elegans* qui sont plus isotropes. Cette différence pourrait expliquer en partie les différences de propriétés mesurées.

La prédominance de mouvements dirigés peut, à mon avis, être en partie expliquée par la dérive du tissu durant l'acquisition. Cette dernière ne résulte pas d'un quelconque artefact mécanique du système optique, mais tout simplement de l'élongation du tissu dans lequel on observe les billes, i.e de l'élongation de la bandelette germinale. La vitesse moyenne d'élongation de dérive du tissu est de, en moyenne, 50 nm.s^{-1} . Or, comme on peut le voir sur la **figure (4.8)** (courbe bleue), environ 40 % des particules dérivent avec une vitesse inférieure ou égale à cette valeur. La médiane des vitesses mesurées est de 60 nm.s^{-1} . Au vu de la diversité des vitesses de dérive, on peut supposer que différents types d'écoulements en sont l'origine. L'allongement du tissu dans la direction antéro-postérieure est associé à un champ de vitesse d'écoulement. À ce champ de vitesses s'ajoutent celles des micro-écoulements d'acto-myosine antéro-postérieur et

1. DANIELS, MASI et WIRTZ 2006.

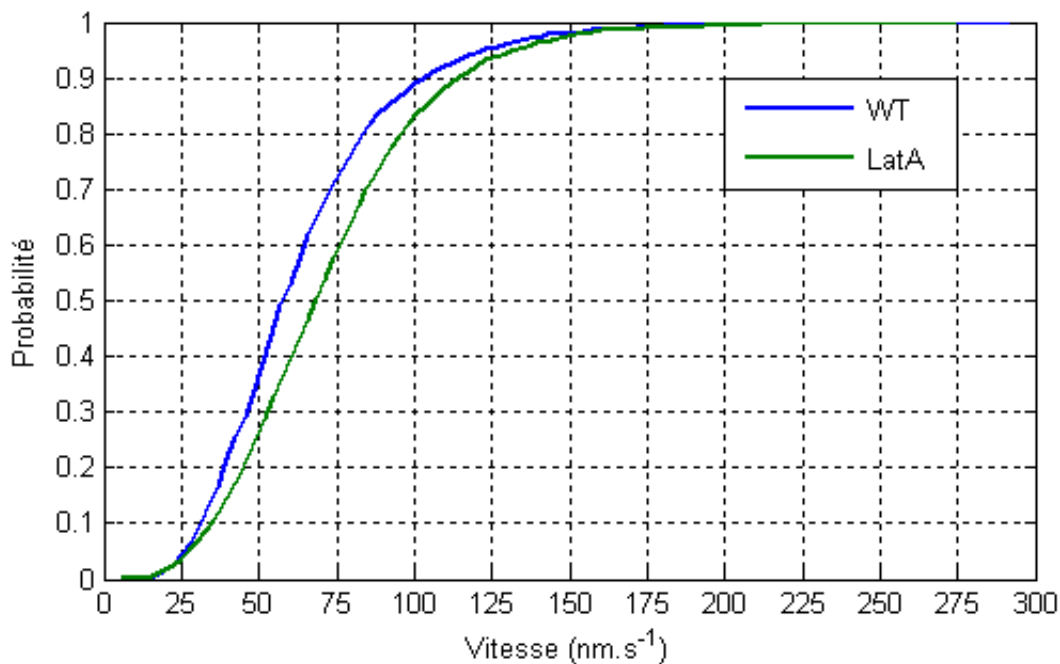


FIGURE 4.8 – Fonction de probabilité cumulative des distributions de vitesses de dérive, billes de 100nm

postéro-antérieur observés par Rauzi *et al*² ayant des vitesses proches de 100 nm.s^{-1} . Et, possiblement, tout autre type de transport cellulaire dont ni les vitesses ni les directions ne sont caractérisées. Ainsi, la superposition de ces écoulements pourrait expliquer nos observations. Cette hypothèse me semble confirmée par la distribution des vitesses observées dans les embryons Latrunculin A (**figure (4.8)**, courbe verte). On constate que celle-ci est décalée vers les grandes vitesses : 20% des billes se déplacent plus vite que 100 nm.s^{-1} , contre 10% chez les embryons sauvages. En revanche, seules 30% des billes dérivent à des vitesses inférieures à 60 nm.s^{-1} , contre 60% dans les embryons WT. Bien qu'aucune mesure de la vitesse de dérive du tissu n'ait été faite, il est raisonnable de penser que celle-ci est inférieure. Puisqu'il a été montré que l'essentiel de l'élongation de la bandelette germinale est causé par le phénomène d'intercalation lui même engendré par l'enrichissement des jonctions dorso-ventrales en moteur moléculaire myosin II dont le partenaire principal est l'actine en partie réduite à l'état monomérique. La latrunculin A ne perturberait pas les transports actifs observés, mais en l'absence d'une partie du réseau d'acto-myosine toute une population de billes jusqu'alors confinées serait relâchée. D'où la baisse du nombre de billes sur-diffusantes observée. Quant aux écoulements antéro-postérieurs d'acto-myosin, soit ils sont peu affectés par la latrunculine A, soit ils ne contribuent pas assez aux mouvements dirigés pour que la différence soit significative. À l'avenir, il serait important d'étudier des mutants pour lesquels l'élongation est bloquée

2. RAUZI, LENNE et LECUIT 2010.

ainsi des embryons traités à la cytochaline D. Les premiers devraient permettre d'étudier la contribution du raseau d'acto-myosin sur cette population, les seconds mettraient en lumière le rôle des transports et écoulements indépendants du réseau d'acto-myosin.

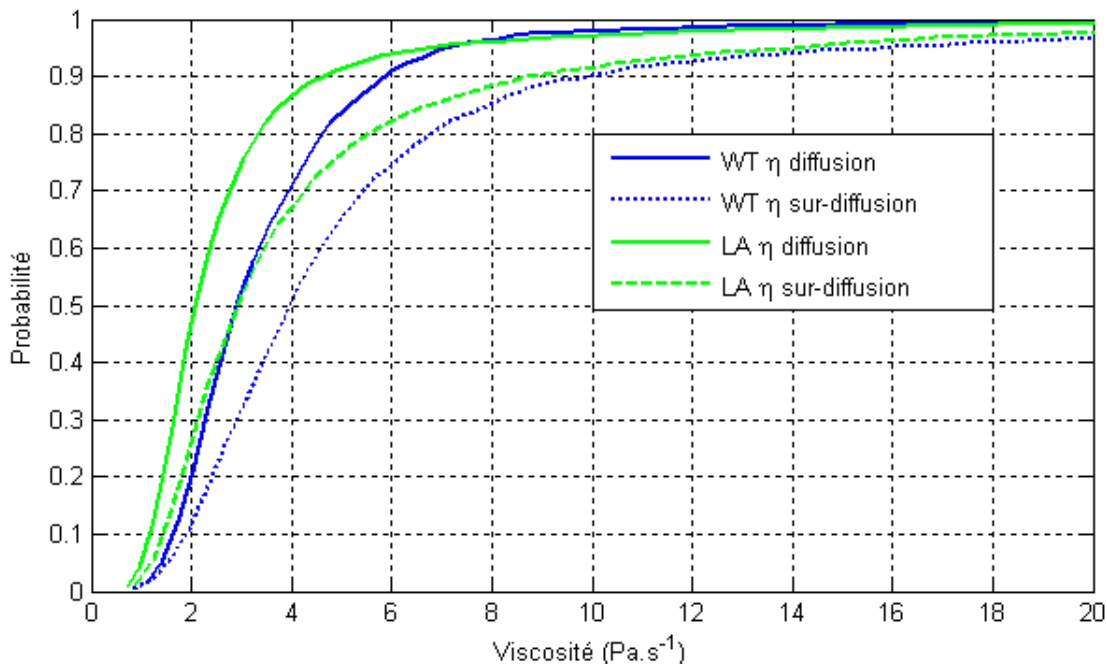


FIGURE 4.9 – Fonction de probabilité cumulative des distributions de viscosités mesurées pour les billes de 100nm

Le traitement à la Latrunculine A produit une réduction de la viscosité (**figure (4.9)**) ce qui indique que les filaments d'actine contribuent à la viscosité du milieu.

Malgré la sous estimation dont elles sont entachées, les viscosités associées aux particules sur-diffusantes sont supérieures à celles des particules diffusant librement, aussi bien pour les embryons sauvages que les Latrunculin A (comparaison des courbes pleines et pointillées de la **figure (4.9)** de chaque couleur).

Particules de 500 nm

Les viscosités mesurées avec des particules de 500 nm sont plus faibles et moins diversifiées qu'avec les particules de 100nm (comparaison entre les **tableaux (4.7)** et **(4.5)**). Cela laisse supposer un milieu intracellulaire plus homogène et plus fluide à ces échelles. En effet, plus une particule est petite, plus elle sera sensible à la porosité du milieu. Une particule plus grosse est moins sensible aux hétérogénéités du milieu qui lui sont inférieures en taille (taille de maille caractéristique d'un réseau d'acto-myosine). On constate un effet drastique des drogues modifiant l'intégrité ou la composition du cyto-squelette sur les viscosité mesurées. Une nouvelle fois, cela indique le rôle du

cyto-squelette dans la construction de la viscosité cellulaire.

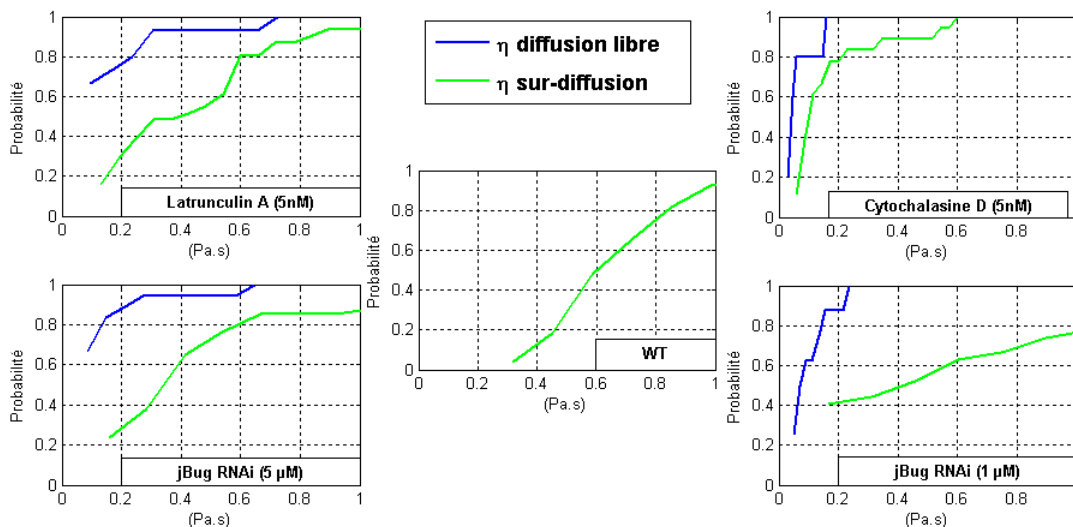


FIGURE 4.10 – Fonction de probabilité cumulative des distributions de viscosité mesurées pour les billes de 500nm

Il est aussi intéressant de noter qu'il ne semble pas nécessaire de s'attaquer aux filaments d'actine pour modifier la viscosité du cytosol. La baisse de celle-ci, observée dans les embryons où un seul isoforme (sur deux) de la protéine de liaison filamine est produit, en est la preuve. Ainsi, l'architecture du réseau d'acto-myosine joue un rôle plus important dans l'établissement des propriétés mécaniques cellulaires que l'intégrité de ses composants principaux.

Comment expliquer la viscosité plus grande dans le cas des particules sur-diffusantes ? On peut imaginer que ces particules soient transportées par un milieu dense comme le réseau d'acto-myosine ou des microtubules et donc plus visqueux.

to

Note sur la mesure de viscosité dans les embryons sauvages pour les billes de 500nm

Dans le cas sauvage, toutes les particules ont un comportement sur-diffusif. Pour cette population particulière, j'ai appliqué un algorithme de correction des viscosités. Cette population exhibe une vitesse de dérive moyenne de $90 \pm 30 \text{ nm.s}^{-1}$, relativement uniforme (comparé aux écarts-type mesurés dans les autres phénotypes), et proche de la vitesse de dérive des embryons. Aussi, je ne considère pas ces embryons comme subissant un transport actif au sein de la cellule, mais plutôt comme dérivant avec le tissu. Leur quantité de mouvement due à la diffusion est faible en raison de leur taille et de la viscosité ($40 \text{ nm}^2 \cdot \text{image}^{-1}$ pour $\eta = 0.8$); aussi, celle induite par la dérive : $v^2 \tau^2$

constante et indépendante de la taille contribue donc dans une plus grande proportion à la MSD mesurée. La probabilité que la bille soit catégorisée sur-diffusive augmente donc avec la taille de la sonde. Au contraire, les particules sur-diffusantes rencontrées chez les autres phénotypes exhibent des vitesses moyennes bien supérieures à la vitesse de dérive, ainsi qu'une grande diversité, synonyme de transport actif et donc peu révélateur de la viscosité globale du cytosol.

Bilan

Dans ce chapitre, j'ai montré que les techniques de mesures mécaniques basées sur le suivi de particules uniques sont applicables au sein de l'embryon de drosophile vivant. La grande diversité d'environnements auxquels les particules sont sujettes implique l'utilisation d'analyses statistiques plus poussées que celle décrite dans ce manuscrit (moyenne et écart-type), et des analyses sur de plus grandes populations d'embryons. De nombreux autres paramètres doivent ainsi être pris en compte, comme le stade de l'embryon, la position de la bille relative à une structure biologique d'intérêt (jonctions, cytosquelette..), la qualité de l'injection... À cet effet, j'espère avoir développé un cadre d'analyse (décrit en méthodologie) suffisamment général pour être utilisé lors d'études ultérieures plus spécifiques.

Aux échelles sondées, le milieu intracellulaire est très visqueux. Le réseau d'acto-myosin, du fait de son intégrité ainsi que de son architecture, joue un rôle important dans l'établissement de cette propriété, comme le montre l'observation de la baisse de viscosité suite à l'endommagement du cyto-squelette.

Les résultats obtenus présentent une grande diversité aux petites échelles, diversité qui reflète la complexité du milieu biologique. Le fait que les mesures semblent s'homogénéiser avec la taille est aussi, à mon avis, un atout de l'approche.

L'absence d'élasticité apparente peut, quant à elle, être expliquée par l'échelle de temps utilisée dans cette étude; des acquisitions de plus longues permettraient l'obtention de MSD supérieures à la seconde. Cela dit, j'entrevois deux obstacles à la réalisation de telles études : la dérive et la perte de sondes au cours du temps. La dérive peut être corrigée de manière logicielle dès lors qu'elle est correctement quantifiée. Pour cela, l'utilisation de marqueurs dédiés (tel que les noyaux) peut être utile, car celle-ci n'est pas homogène au niveau cellulaire. Le second obstacle est dû au fait que les sondes diffusent dans les trois directions de l'espace dans des cellules qui sont bien plus épaisses que le plan optique que l'on image. Aussi, au cours de sa diffusion, une particule a la possibilité de sortir du plan d'imagerie. Cette probabilité augmentant avec la longueur de l'acquisition et le coefficient de diffusion de la bille, un biais est alors introduit, dans la mesure où les trajectoires suffisamment longues pour donner de grandes MSD ont statistiquement pour origine des particules diffusant peu. Par contre, il est possible de considérer ce phénomène comme une tri naturel des particules confinées.

Chapitre 5

Expériences de pinces optiques in vivo

Bélier optique

En général, une mesure rhéologique avec une pince optique s'effectue de la manière suivante : le laser de piégeage oscille autour d'une position moyenne avec une fréquence et une amplitude fixées, pendant que les mouvements de la sonde sont enregistrés par un détecteur de position. Le déphasage et l'amortissement de la trajectoire de la bille par rapport à celle du laser nous renseignent respectivement sur la viscosité et l'élasticité du milieu à cette fréquence (**figure 5.1 (A)**). Ce type de mesure ne pouvant être employé dans la drosophile en raison de l'absence de détecteur de position, j'ai dû développer d'autres approches afin de sonder la mécanique du milieu.

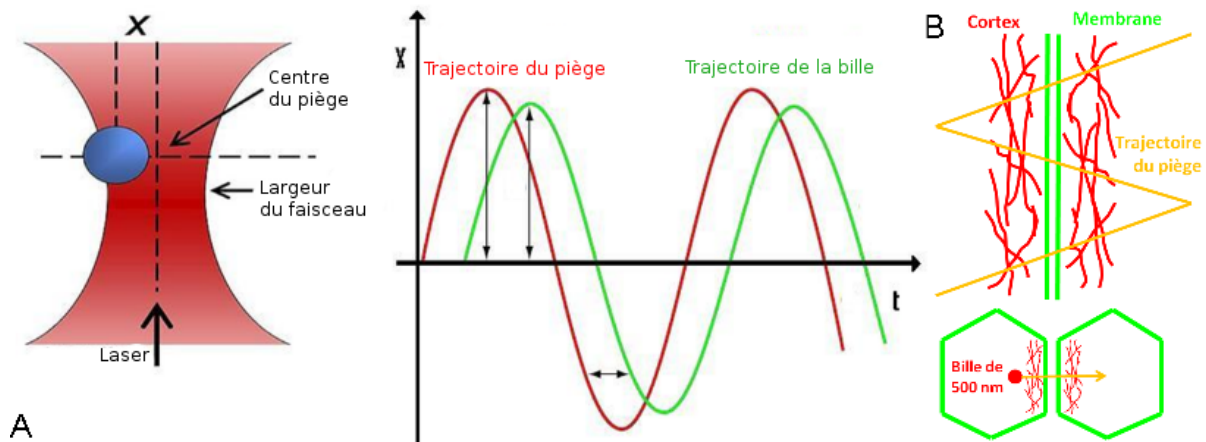


FIGURE 5.1 – (A) Représentation schématique d'une mesure rhéologique à l'aide d'une pince optique.(B) Représentation d'une manipulation de bélier optique.

Il a été proposé que certains mouvements morphogénétiques, en particulier l'élongation de la bandelette germinale ou arrangement intracellulaire, ont pour origine des anisotro-

pies de tensions le long des jonctions cellulaires¹. D'autre part, la majorité des modèles mécaniques considèrent les jonctions comme l'élément mécanique où les forces sont produites et transmises². C'est donc naturellement que j'ai cherché à sonder leur mécanique à l'aide de la pince optique. Pour ce faire, je déplace périodiquement à vitesse constante (périodes en dents de scie) une bille le long d'une trajectoire au milieu de laquelle se dresse la membrane (**figure 5.1 (B)**). Ainsi la bille exerce périodiquement une force sur la jonction. En fonction des différents paramètres de manipulation (vitesse de la bille, amplitude d'oscillation, débord du laser par rapport à la jonction...) et de l'image qu'on analyse (Canal de fluorescence de la particule ou canal de fluorescence GFP), nous avons développé différentes méthodes nous permettant de mesurer quantitativement la rigidité orthogonale des jonctions, leur tension et enfin la distance de propagation d'une déformation locale. Ces méthodes d'analyse reposent toutes sur la même manipulation : collision périodique de la bille piégée avec la jonction, que l'on nomme "bélière optique" (*optical ramming or optical ram* en anglais) en analogie aux bélières mécaniques macroscopiques dont le rôle principal est de sonder la solidité de nos portes depuis des temps immémoriaux.

5.1 Mesure de la rigidité des jonctions

Principe et hypothèses.

Même si on n'a pas d'accès direct à la distance entre la bille et le piège au cours d'une manipulation, la trajectoire de la bille peut être mesurée avec une précision nano-métrique à partir des images enregistrées lors de l'expérience. Pour cela, un kymographe le long de la trajectoire de la bille est réalisé (multipleKymograph, imageJ) puis analysé à l'aide d'un script Matlab qui en extrait sa position au cours du temps par ajustement gaussien. On obtient alors la trajectoire précise au cours de temps de la bille telle qu'illustrée en **figure (5.1)**, celle-ci dépendant du milieu et des obstacles rencontrés par la bille au cours de son parcours. Comme on l'a vu pour les billes de 500nm, le cytosol peut être considéré comme un milieu visqueux relativement homogène ($0.8 \pm 0.4 Pa.s$). Donc si une bille se déplace dans celui-ci, sa trajectoire doit ressembler à celle du laser (au déphasage près). Par contre, quand la bille rencontre la jonction, celle-ci s'oppose au mouvement de la particule piégée et la ralentit. Éventuellement, si le piège poursuit son mouvement bien au-delà de la jonction, celle-ci va opposer une force supérieure à celle du piège, et la bille ne sera plus soumise qu'à la réponse mécanique de celle-ci. Dans plus de 99 % des cas, on observe un retour en arrière de la bille que l'on attribue à la relaxation orthogonale de la jonction (**figure (5.1)**).

Afin d'interpréter ces trajectoires, nous avons proposé un modèle mécanique simple illustré en **figure (5.6 (A))** : le cytosol est purement visqueux de viscosité connue, la jonction réagit comme un ressort Hookéen et possède donc un coefficient de rigidité

1. RAUZI, VERANT et al. 2008.

2. ISHIHARA et al. 2013.

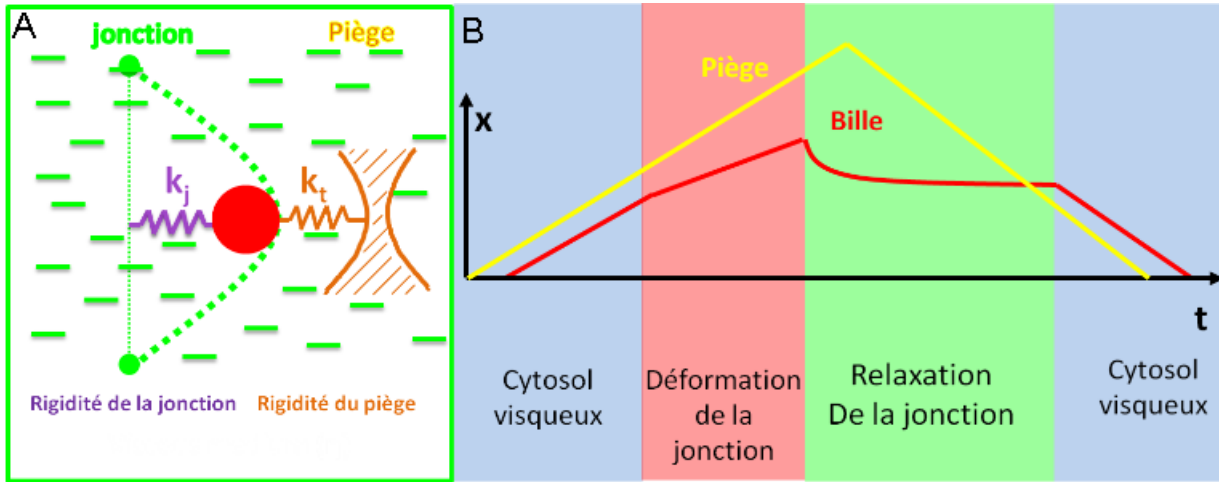


FIGURE 5.2 – Trajectoires attendues du laser (courbe jaune) et de la particule (courbe rouge) suite à la collision de la bille avec la membrane dans le cas d'un cytosol visqueux et d'une membrane élastique.

constant (du moins pour chaque dynamique de déformation), coefficient de rigidité que l'on cherche à mesurer, et enfin le piège est aussi considéré comme un ressort parfait. Selon ce modèle on peut décomposer en trois régime :

- **Régime visqueux** : la bille se déplace dans le cytosol à la vitesse du piège avec un léger déphasage non mesurable (régime bleu sur la **figure (5.6 (B))**).
- **Collision** : phase durant laquelle la bille déforme la membrane ; la vitesse de déplacement de la bille peut alors être exprimée comme :

$$k_{Junction} = k_{Piège} \left(\frac{V_{Piège}}{V_{Bille}} \right) \quad (5.1)$$

où $k_{Junction}$ représente la rigidité de la jonction, $k_{Piège}$ celle du piège, $V_{Piège}$ la vitesse du piège (paramètre connu de la manipulation) et V_{Bille} la vitesse du piège que l'on mesure. Ce régime est illustré en rouge sur la figure **(5.6 (B))**.

- **Relaxation** : dans ce régime la bille n'est plus soumise au piège optique et revient en arrière sous l'effet du retour à l'équilibre/relaxation de la jonction. La modélisation de ce régime est identique à celle utilisée pour calibrer les pinces optiques : particule sphérique attachée à un ressort dans un milieu visqueux ; aussi, le temps caractéristique de relaxation τ est égal au rapport de la viscosité du milieu sur la raideur de la jonction (voir **l'équation (3.30)**). Ce régime est illustré en vert sur la figure **(5.6 (B))**.

On peut donc mesurer le coefficient de raideur de la jonction de deux manières différentes à partir d'une seule trajectoire : en mesurant la vitesse de la particule durant

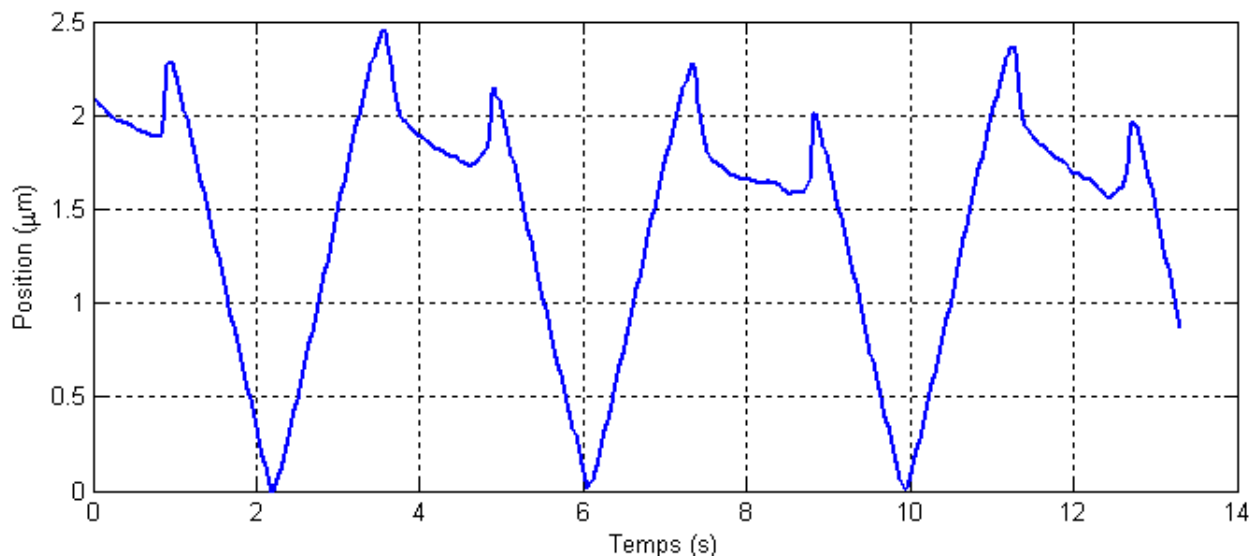


FIGURE 5.3 – Exemple de trajectoire suivi par la bille au cours d’une expérience de bélière optique.

la collision, et en mesurant le temps caractéristique de relaxation de la particule une fois celle-ci lâchée par le piège. Afin d’obtenir des mesures quantitatives, la viscosité du milieu est nécessaire soit directement lors de l’ajustement des relaxations, soit indirectement dans le calcul de la raideur du piège. À cet effet, des mesures de viscosités par suivi de particules uniques ont été réalisées pour chacun des phénotypes étudiés (**section 4.2**).

Difficultés rencontrées

Deux problèmes ont systématiquement été rencontrés lors de ces expériences et doivent être pris en considération :

- **Mesure de la vitesse de collision** : Les vitesses de déplacement du laser sont, selon les expériences, comprises entre $1\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et $2\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. L’acquisition est cadencée à 38 Hz, donc la distance parcourue par le laser entre deux images est de 25-50 nm. On comprend bien que si une jonction se déforme de 100-200nm, l’échantillonnage de la collision comprend au maximum 8 positions. Or les dernières positions correspondent à la limite de piégeage de la pince optique et dans ce régime, cette dernière ne peut plus être considérée comme un ressort parfait. Dans ces conditions, la formule (5.1) n’est plus valable. Ainsi, la mesure de la vitesse de collision ne peut s’effectuer que sur quelques points et il est très difficile d’établir la limite du régime linéaire de la pince. Aussi, selon que la vitesse de collision est mesurée sur n ou $n+1$ point, la rigidité mesurée change drastiquement. C’est, à mon avis, la cause principale de la grande diversité de valeurs de rigidité que l’on trouve par cette méthode (**cf tableau 5.4**).

- **Échappement linéaire s’ajoutant à la relaxation exponentielle** : Nous avons également constaté dans la majorité des relaxations observées l’absence de position d’équilibre. Au régime exponentiel de relaxation semble s’ajouter un régime linéaire d’éloignement de la jonction : la bille continue de s’éloigner à une vitesse constante de, en moyenne, $200nm.s^{-1}$. Le fait que cette vitesse soit constante reflète sa nature non diffusive, mais jusqu’à présent nous n’avons pas pu identifier l’origine de ce phénomène. Pour limiter son influence sur la mesure du coefficient de raideur, un terme linéaire a été rajouté à la formule utilisée pour l’ajustement de la relaxation. La nature périodique du bélier optique (période de 2 secondes pour la majorité des expériences) nous a empêché d’observer ce phénomène à plus long terme.

Mesures *in-vivo*

Des mesures de raideur de jonctions ont été réalisées pour les différents phénotypes présentés dans la partie Résultats des expériences de suivi de particule (**section 4.2**). Pour chaque jonction sondée, le bélier frappe en moyenne quatre à six fois la jonction ciblée. Pour l’analyse, différents paramètres sont enregistrés pour chaque jonction :

- Les paramètres du bélier : période, amplitude et orientation (angle de la trajectoire par rapport à l’axe antéro-postérieur de l’embryon) ;
- Information relatives à la jonction : taille, orientation (même définition que précédemment) et distance du point d’impact au vertex le plus proche ;
- Mesures : vitesse d’impact, temps caractéristique de relaxation, et vitesse d’échappement.

Les mesures de raideurs réalisées dans des embryons sauvages ou traités avec des drogues sont résumées dans le **tableau (5.4)** :

Bilan

Les raideurs mesurées sont similaires à celle rapportées par Krieg *et al*³ pour des cellules extraites de poisson zèbre et mesurées par AFM (atomic force microscopy). D’autre part, l’altération du cyto-squelette a pour effet la diminution des raideurs mesurées comme attendu. Ainsi, le bélier optique permet de mesurer quantitativement des raideurs *in vivo*, ce qui, à ma connaissance, constitue une première.

L’absence d’une partie de la filamine semble réduire la raideur presque autant que pour les traitements où les filaments d’actine sont ciblées. Ce résultat confirme ce qui a déjà été observé pour la viscosité dans le cadre des expériences de suivi de particules : l’architecture du réseau d’actine joue un rôle prédominant dans l’établissement des propriétés mécaniques des cellules.

3. KRIEG et al. 2008.

		$pN.\mu m^{-1}$				
		Moyenne	écart type	erreur standard	N_{impact}	$N_{jonctions}$
WT	$K_{Collision}$	90	140	20	54	15
	$K_{relaxation}$	60	40	4	106	25
Cyto D	$K_{Collision}$	40	20	3	36	12
	$K_{relaxation}$	3	2	0.2	36	12
Lat A	$K_{Collision}$	40	16	20	44	13
	$K_{relaxation}$	8	5	1	46	13
jBug ($5\mu M$)	$K_{Collision}$	47	23	4	42	11
	$K_{relaxation}$	6	6	1	68	16

FIGURE 5.4 – Raideurs mesurées de deux manières différentes dans les différents phénotypes.

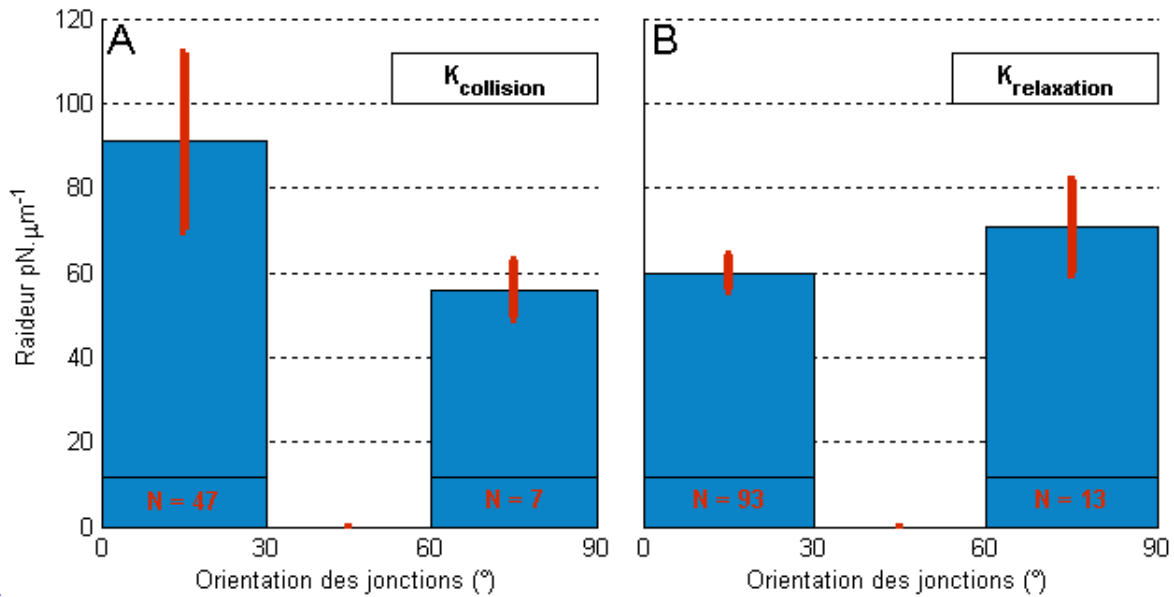


FIGURE 5.5 – Valeur moyenne des raideurs en fonction de l’orientation des jonctions pour $K_{Collision}$ (A) et $K_{Relaxation}$ (B). Les barres d’erreurs représentent l’erreur standard de chaque distribution.

Si on met en relation le contexte biologique (orientation des jonctions) et les mesure de raideurs (cf figure (5.5)), on remarque que les deux méthodes donnent des résultats différents. Malgré le faible nombre de mesures, on peut distinguer que les raideurs $K_{Collision}$ sont plus importantes pour les jonctions dorso-ventrales (0 degré) que pour les jonctions antéro-postérieures (90 degré). On ne retrouve pas cette tendance avec les $K_{Relaxation}$. Or Bertet *et al*⁴ rapportent à ce stade du développement un enrichissement en myosine II des jonctions dorso-ventrale à l’origine de l’anisotropie de tensions rapportée par Rauzi *et al*⁵. On peut raisonnablement penser que les jonctions présentant une tension supérieure sont plus difficiles à déformer orthogonalement à leur orientation comme on le fait avec le béliet optique, donnant lieu à une raideur supérieure. Ainsi, la mesure de raideur $K_{Collision}$ donne des résultats plus justes que $K_{Relaxation}$.

Malgré des mesures relativement similaires dans les embryons sauvages, on remarque une différence systématique d’un facteur 5 à 10 entre $K_{Collision}$ et $K_{Relaxation}$. Deux raisons peuvent expliquer cela : soit la mesure de la vitesse de déformation est trop aléatoire, soit l’hypothèse que le retour à l’équilibre de la jonction serait équivalent à un ressort traînant une sphère est une vision trop réductrice de la complexité du milieu. En effet, malgré les aléas de mesure de la vitesse, la mesure durant la collision fait moins d’hypothèse concernant le milieu, elle ne nécessite que la connaissance de la raideur du piège. Son alternative, la mesure de la relaxation nécessite en revanche la connaissance

4. BERTET, SULAK et LECUIT 2004.

5. RAUZI, VERANT et al. 2008.

du coefficient de traînée d'une sphère en contact avec la membrane, et donc au minimum de la viscosité en ce point précis. Or la viscosité mesurée dans le cadre des expériences de suivi de particules correspond plus à une valeur générale à l'échelle de la cellule. L'inexactitude des mesures $K_{Relaxation}$ est confirmée par l'absence d'anisotropie dorso-ventrale.

5.2 Mesures des tensions jonctionnelles

Principe et hypothèses

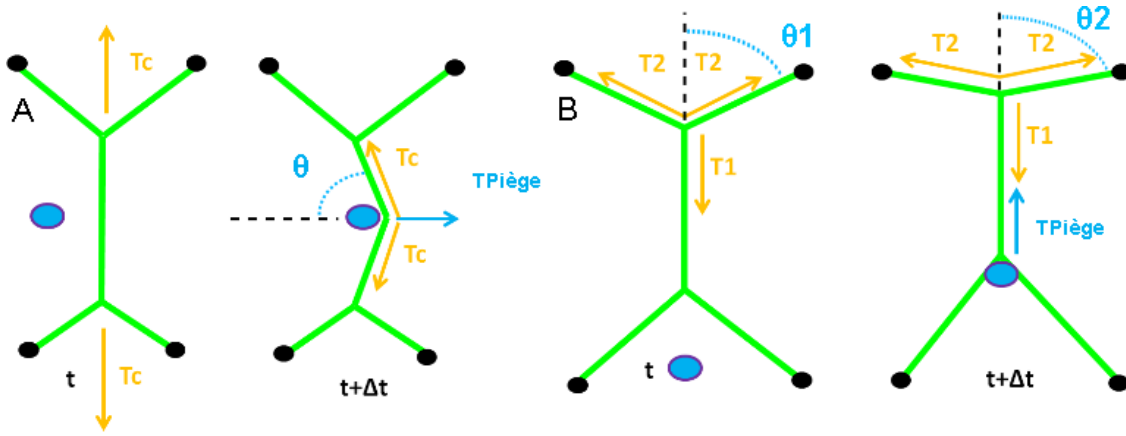


FIGURE 5.6 – (Représentation schématique d'une expérience de mesure de la tension emmagasinée au sein de la jonction.

Elle repose de la même manière que les expériences d'ablation sur le fait que le tissu est en équilibre permanent. On considère que la jonction se comporte comme une corde sous tension que l'on déforme orthogonalement à sa direction à l'aide de la pince optique comme illustré dans la figure (5.6). Il devient alors possible d'établir une équation d'équilibre des forces entre la force exercée par le piège $F_{Piège}$ et les forces tangentielles du cortex F_C tel que :

$$F_{Piège} + 2F_C = 0 \quad (5.2)$$

que l'on réécrit sous la forme :

$$T_{Piège} = 2\cos(\theta)T_C \quad (5.3)$$

où θ est l'angle de la déformation créée par la bille. Ainsi, si on connaît $F_{Piège}$, la mesure de F_C est possible. Pour déterminer $F_{Piège}$, nous utilisons la position à laquelle la bille échappe au piège, identifiable par un changement de vitesse. Dans ce cas-là, la jonction exerce sur la bille $F_{échappement}$ qui peut être estimée. Au vu des diverses études menées

avec des pinces optiques et des abaques de forces⁶, il me semble correct d'estimer la force d'échappement entre 30 pN et 40 pN pour la puissance de laser utilisée ($\sim 350mW$) (cf section (3.3.1)).

Mesures *in-vivo*

La mesure est réalisée en observant la déformation du tissu. Aussi, elle est limitée par la qualité d'imagerie du système qui, comme mentionné précédemment, est loin d'être équivalente que celle que l'on obtiendrait en utilisant un microscope confocal moderne. Par conséquent, le nombre de films se prêtant à cette mesure se résume à deux (**figure (5.7)**).

La **figure (5.7)** montre les deux résultats obtenus nous permettant d'observer les positions de la bille et de la membrane.

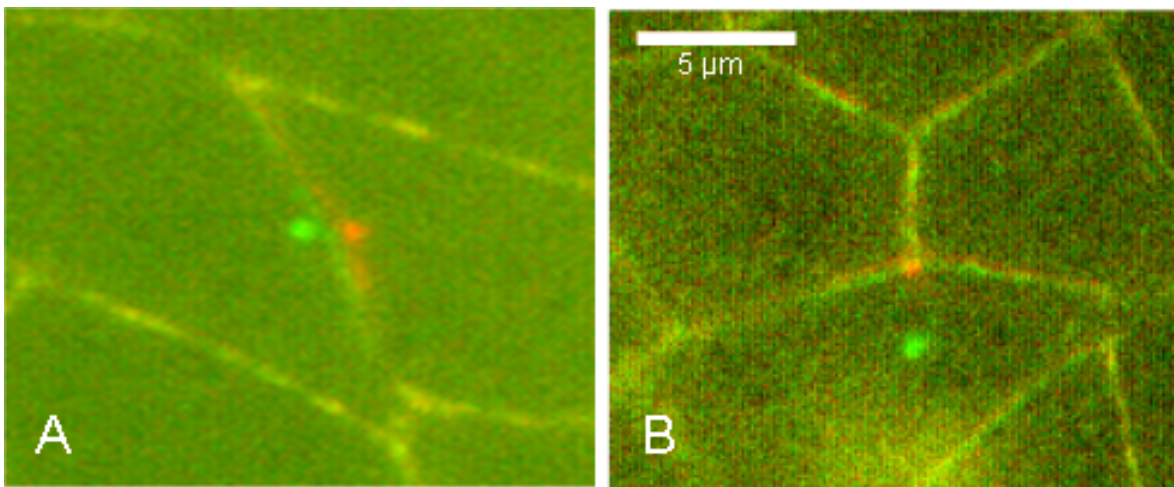


FIGURE 5.7 – (Déformation locale induite par l'impact de la bille sur la membrane. Il s'agit de la superposition de deux images issues du même film à des temps différents. les schémas représentés en **figure (5.6)** correspondent aux expériences ici représentées.

Sur les images de la **figure (5.7)** sont représentés, par superposition de deux couleurs, la déformation maximale (en rouge) de la jonction et son état au repos (en vert). Les mesures de déformation permettent d'obtenir les valeurs de tension suivante :

- $T_c \sim 100pN$ ((5.7 (A)))
- $T_2 \sim 340pN$ ((5.7 (B)))
- $T_1 \sim 400pN$ ((5.7 (B)))

Il est très important de garder à l'esprit que la force précise exercée par la pince optique est inconnue. De même, la force maximale (ou d'échappement) n'a pas été

6. NAHMIA et ODDE 2002.

mesurée. Les mesures effectuées nous renseignent donc sur les ordres de grandeurs des tensions. Si on considère qu'un moteur de myosine II peut produire une force de 4 pN⁷, cela indique que quelques dizaines de moteurs moléculaires suffisent à produire des déformations du même ordre de grandeur.

5.3 Propagation d'une déformation locale

Comme on a pu le voir précédemment, il est possible de déformer localement une jonction cellulaire avec les pinces optiques. Si l'analyse de la trajectoire de la bille permet de mesurer une tension jonctionnelle ainsi que la déformation locale maximale, elle ne nous apprend rien sur une éventuelle propagation/réaction du réseau mécanique voisin. Les phénomènes tels que les blebs⁸ ou les expériences d'extrusion de membrane⁹ montrent bien qu'il est possible de déformer localement une jonction sans pour autant affecter la forme ou la mécanique globale de la cellule. Mais au cours de mes expériences de bélier optique, il m'est arrivé d'observer une fluctuation périodique de certaines jonctions voisines du point d'impact (**figure 5.8**). Une comparaison des kymographes de la jonction au point d'impact et d'une jonction voisine m'a permis de confirmer mon observation. En effet, on peut distinguer sur la **figure (5.8 C)** une faible variation périodique de la position de la membrane avec le temps. La fréquence de ce mouvement est identique à celle du bélier. J'en déduis donc que la force locale appliquée sur la jonction par la pince optique est suffisante dans certain cas pour perturber l'équilibre mécanique des forces du réseau jonctionnel et donc entraîner un rééquilibrage du réseau se traduisant par un léger déplacement des jonctions.

Malheureusement, en raison du faible SNR des jonctions (marquées par les protéines d'E-cad fusionnée à la GFP), il est très difficile d'obtenir des kymographes où l'on distingue cette fluctuation. Comme on peut le voir sur la **figure (5.8 C)**, même si on distingue un déplacement périodique de la jonction, la mesure de son amplitude reste très approximative. Je n'ai, par exemple, jamais réussi à résoudre avec précision la position cette membrane au cours du temps par ajustement gaussien. Aussi, afin de pouvoir obtenir des mesures quantitatives à partir de ce type d'expériences, j'ai développé une méthode d'analyse d'images/flux vidéo permettant d'identifier les jonctions concernées par le rééquilibrage temporaire et périodique des forces, de mesurer leur déplacement ainsi que leur déphasage avec l'oscillateur principal qu'est le bélier.

7. HOWARD 2001.

8. MILLS et al. 1998.

9. HOCHMUTH et al. 1982.

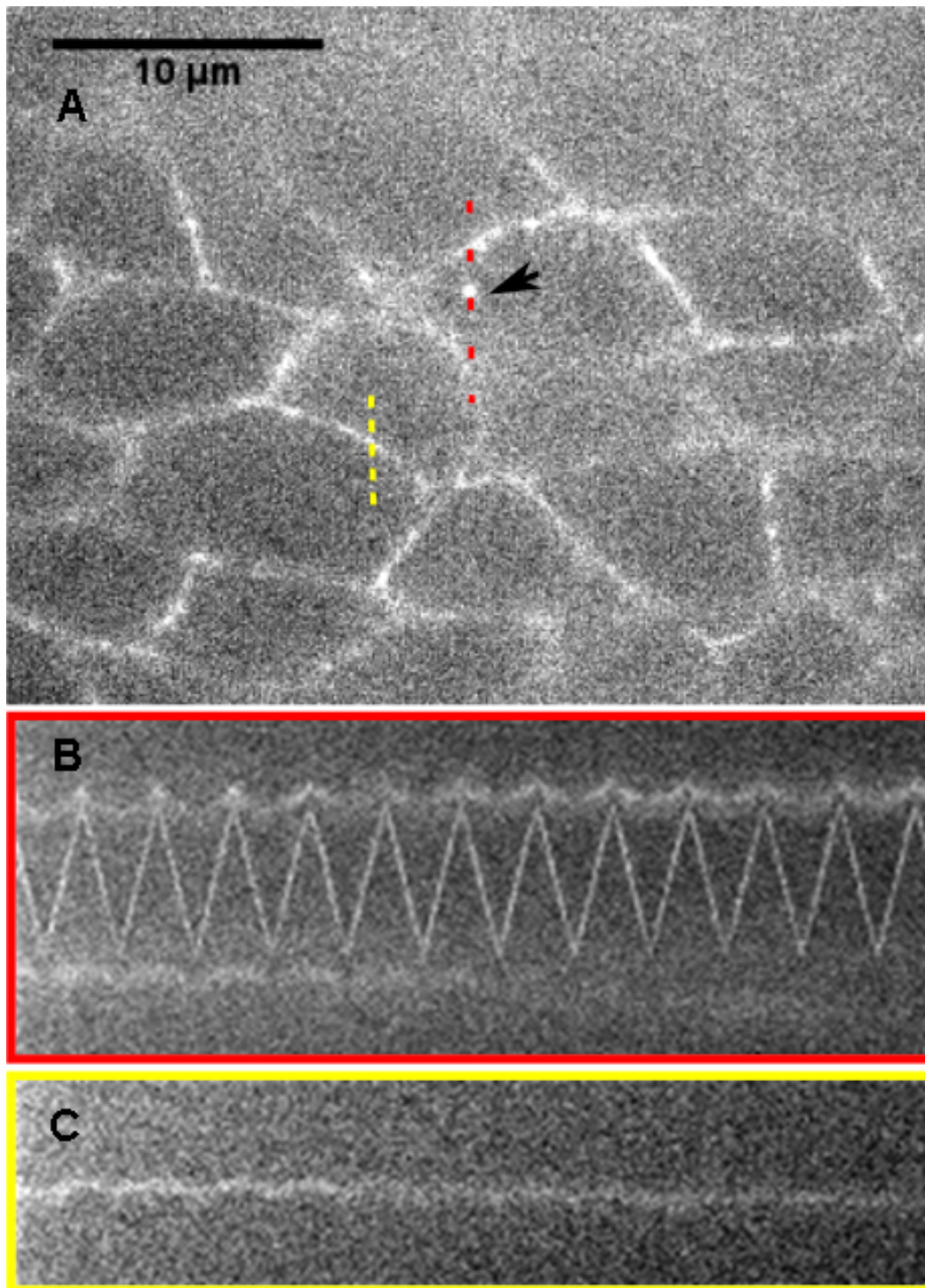


FIGURE 5.8 – (A) Image extraite d’une expérience de béliet optique. La bille de 500 nm de diamètre (flèche noire) suit une oscillation en dents de scie de fréquence 1 Hz. (B) Le kymographe généré le long de la ligne pointillée rouge permet de visualiser l’oscillation de la bille ainsi que la déformation locale de la jonction supérieure. (C) Kymographe généré le long de la ligne pointillée jaune. On peut y distinguer un déplacement périodique vertical de la jonction.

5.3.1 Détection synchrone

Principe

L'analyse de Fourier constitue la méthode la plus directe et la plus aisée pour l'analyse de signaux périodiques. Dans le cas présent, je l'emploie pour identifier les pixels présentant une variation d'intensité périodique à la fréquence du bélier. Le rééquilibrage des jonctions se traduit localement par leur déplacement périodique, aussi certains pixels enregistrent une fluctuation d'intensité de période identique. Une illustration de ce phénomène est présenté en **figure 5.9**. Pour identifier/filtrer ces fluctuations, il suffit de réaliser une transformée de Fourier temporelle de la courbe d'intensité des différents pixels. On peut alors construire une image à partir des amplitudes des différentes fréquences. En résulte ainsi une séquence d'images où chacune d'elles correspond à une fréquence composée de pixels ayant la valeur de l'amplitude de cette composante fréquentielle.

L'autre avantage à l'utilisation de la transformée de Fourier, c'est qu'elle fournit aussi une information sur la phase de l'oscillation. À chaque pixel sont associés, après transformation, une valeur d'amplitude pour chaque fréquence ainsi qu'un angle de phase. On peut donc construire une image à partir de ces angles de la même manière que pour l'amplitude. Cette nouvelle image nous permet alors de mesurer le déphasage entre les jonctions qui se rééquilibrent et la déformation locale qui en est la cause.

L'application de cette méthode au film correspondant à la **figure (5.8)** permet de visualiser les jonctions qui subissent la perturbation périodique (**figure 5.10 (B)**). Si à ce stade on peut identifier les pixels fluctuant à la bonne fréquence, il n'est pas encore possible d'y mesurer l'amplitude de déplacement des jonctions. Pour cela il est nécessaire de connaître le lien entre la fluctuation d'intensité d'un pixel et l'amplitude d'oscillation de la jonction, ceci pour ensuite connaître la relation formelle entre l'amplitude A et l'intensité dans l'espace de Fourier à la fréquence de l'oscillateur $I(\omega_0)$.

Modèle

En simplifiant le problème à une dimension, on peut considérer que le signal émis en un point de la jonction est un profil gaussien oscillant de manière sinusoïdale :

$$I_0 \exp \left[-\frac{(x - A \sin(\omega_0 t) - x_0)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (5.4)$$

où I_0 est l'intensité de la gaussienne, σ son écart-type et x_0 la position autour de laquelle elle oscille. A représente l'amplitude d'oscillation et ω_0 la fréquence. La gaussienne oscille au dessus d'une rangée de pixels, comme illustré sur la **figure 5.11**. L'intensité instantanée enregistrée par un pixel est donnée par l'intégration spatiale de **l'équation (5.4)** sur la largeur d'un pixel :

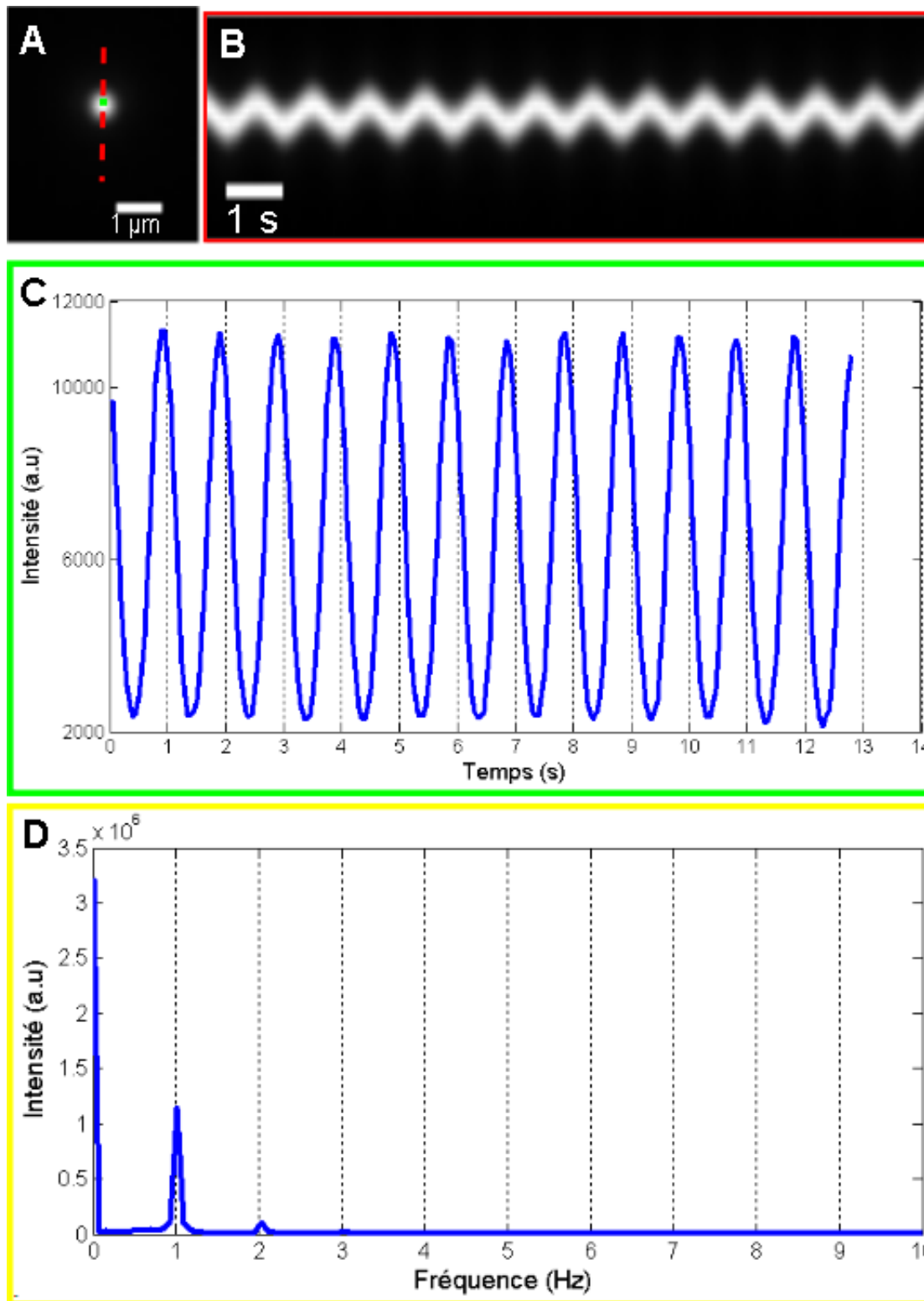


FIGURE 5.9 – (A) Image extraite d'une manipulation de bille. La bille se déplace selon une sinusoïde de fréquence 1 Hz dans de l'eau. (B) Kymographe généré le long de la ligne pointillée rouge. (C) Variation de l'intensité enregistrée par le pixel marqué par un point vert en A. (D) Transformée de Fourier de C, permet de retrouver la fréquence fondamentale d'excitation.

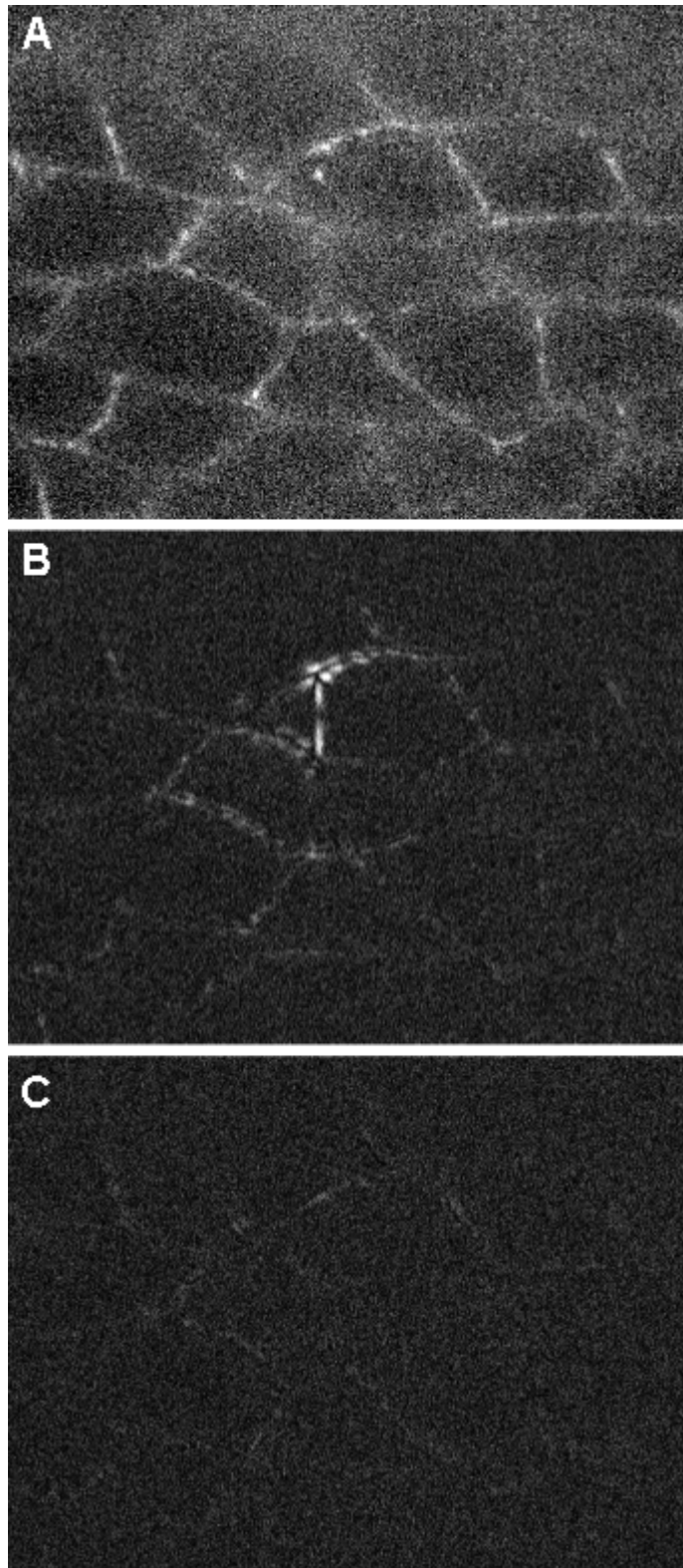


FIGURE 5.10 – (A) Image extraite d’une expérience de béliet optique. (B) Image résultante de l’analyse fréquentielle (cette image correspond à la fréquence ω_0 (1 Hz) de l’oscillateur). (C) Image résultante de l’analyse fréquentielle (cette image correspond à la fréquence $\omega_0 + 0,2Hz$ soit 1,2 Hz).

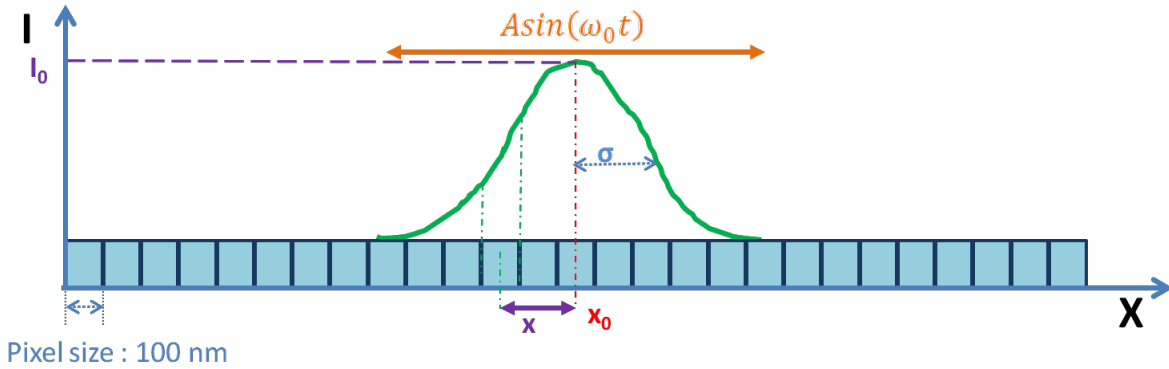


FIGURE 5.11 – Profil gaussien d'une jonction oscillant à l'image. La segmentation de l'abscisse représente les pixels imageant le profil.

$$\int_0^{pix} I_0 \exp \left(-\frac{(x - A \sin(\omega_0 t) - x_0)^2}{2\sigma^2} \right) dx \quad (5.5)$$

où pix est la largeur d'un pixel (100nm dans le plan image). Reste encore à intégrer (5.5) temporellement sur la durée de l'acquisition :

$$I(t_n) = \int_{n\Delta t}^{(n+1)\Delta t} \int_0^{pix} I_0 \exp \left(-\frac{(x - A \sin(\omega_0 t) - x_0)^2}{2\sigma^2} \right) dx dt \quad (5.6)$$

avec Δt le temps d'exposition. L'équation (5.6) permet de calculer les variations temporelles de signal vu par un pixel telle que vue en (figure 5.9 C). Sa transformée de Fourier (TF) permet d'obtenir la courbe (5.9 D) :

$$I(k) = \sum_{n=0}^{N-1} \int_{n\Delta t}^{(n+1)\Delta t} \int_0^{pix} I_0 \exp \left(-\frac{(x - A \sin(\omega_0 t) - x_0)^2}{2\sigma^2} \right) dx dt \exp \left(-2i\pi k \frac{n}{N} \right) \quad (5.7)$$

avec $k = 2\pi\omega$ la pulsation. Cette équation n'est pas résoluble analytiquement, j'ai donc eu recours à des simulations informatiques pour calculer une approximation de la solution.

Abaque

Dans l'équation ci dessus deux paramètres sont inconnus : l'amplitude d'oscillation et la distance du pixel à la position moyenne de la jonction ($x - x_0$). Les autres sont soit fixés comme paramètres de l'expérience :

- Δt le temps d'exposition ;
- pix la taille d'un pixel dans le plan image : 100 nm ;
- ω_0 la fréquence d'oscillation du béliet.

soit ils sont mesurables à l'image :

- I_0 l'amplitude de la gaussienne i.e l'intensité de fluorescence de la jonction ;
- σ l'écart-type de la gaussienne i.e la taille de la tâche d'Airy (les jonctions étant plus petites que la limite de diffraction).

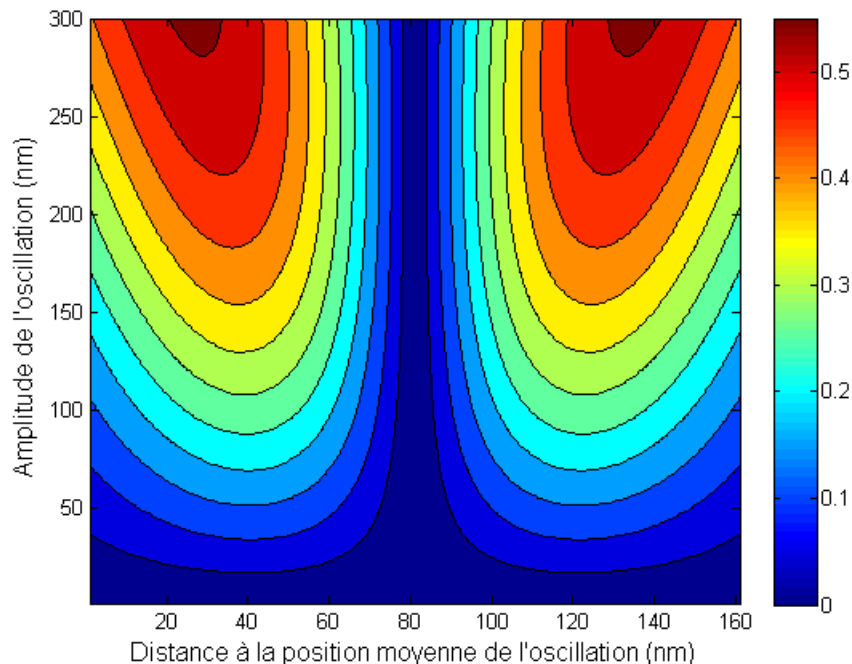


FIGURE 5.12 – Abaque où on peut lire la valeur $I(\omega_0)$ d'un pixel en fonction de sa distance à la position moyenne de l'oscillateur et de l'amplitude d'oscillation.

J'ai donc tracé une carte (**fig. 5.12**) des différentes intensités que peut prendre un pixel en fonction de l'amplitude d'oscillation de la jonction et de sa distance à la position moyenne d'oscillation. Comme on le voit sur la **fig. 5.12**, il n'existe pas de solution unique : une valeur de $I(\omega_0)$ peut être la solution d'un ensemble de couples amplitude-distance. Il faut donc trouver une méthode permettant de réduire cette multiplicité de solution.

Pour cela, je me suis inspiré de la forme qu'a la trace d'un objet oscillant après transformation. Comme on peut le voir en **fig. 5.13 (B)**, la trace se caractérise par deux lobes intenses séparés par un sillon sombre. Profil que l'on retrouve aussi sur l'abaque et qui est aisément compréhensible : le pixel central (dans lequel se trouve la position moyenne d'oscillation) enregistre une fluctuation d'intensité d'une fréquence deux fois supérieure aux pixels extérieurs. En effet, durant une période, la jonction va passer deux fois au dessus du pixel central et qu'une seule fois au dessus des pixels extérieurs. On retrouve ce doublement de fréquence sur l'image construite après transformation à la fréquence $2\omega_0$: **fig. 5.13 (C)**, où on voit un lobe central et deux lobes extérieurs. Les deux lobes extérieurs sont une harmonique de rang 2 de la fluctuation d'intensité qui n'est pas une pure sinusoïde.

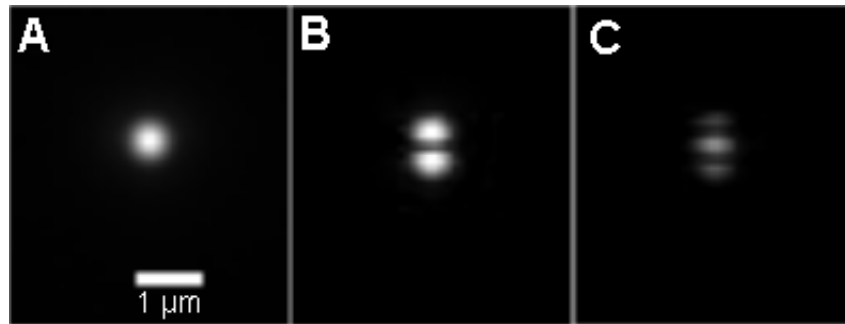


FIGURE 5.13 – (A) Image extraite d’une expérience où une bille de 500 nm suit une trajectoire sinusoïdale de fréquence 1 Hz. (B) Image résultant de la détection synchrone à 1 hz. (C) image résultant de la détection synchrone à 2Hz.

Pour réduire la multiplicité des solutions, je recherche dans l’abaque le motif de positions amplitude-distance présentant le plus de similitude avec le profil d’amplitude de la trace à ω_0 . La recherche est effectuée par un algorithme de minimisation des différences au carré. J’obtiens ainsi une mesure de l’amplitude d’oscillation ainsi que de la position moyenne d’oscillation.

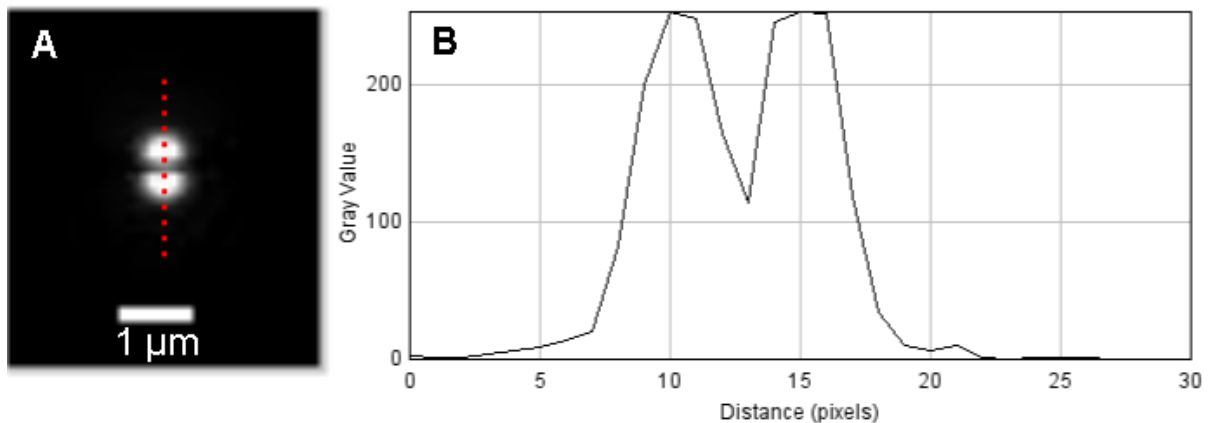


FIGURE 5.14 – (A) Image résultant de la détection synchrone à ω_0 . (B) Profil des intensités sous la ligne rouge. C’est l’ensemble des différentes valeurs de ce profil (les 5 du milieu) que l’on cherche à positionner sur l’abaque.

Test

Avant de mesurer les amplitudes de déformation observées dans l’embryon, j’ai tenu à vérifier la précision de cette méthode de mesure. Pour cela, j’utilise des billes de 500 nm de diamètre diluées dans du glycerol, auxquelles j’impose un mouvement sinusoïdal de fréquence et d’amplitude connues. Le **graphique 5.15** montre la correspondance entre les amplitudes imposées et celles mesurées. On peut voir que pour un régime d’amplitude

de 10 nm à 200 nm, la méthode de détection synchrone fournit une mesure précise de l'amplitude à une dizaine de nanomètres près.

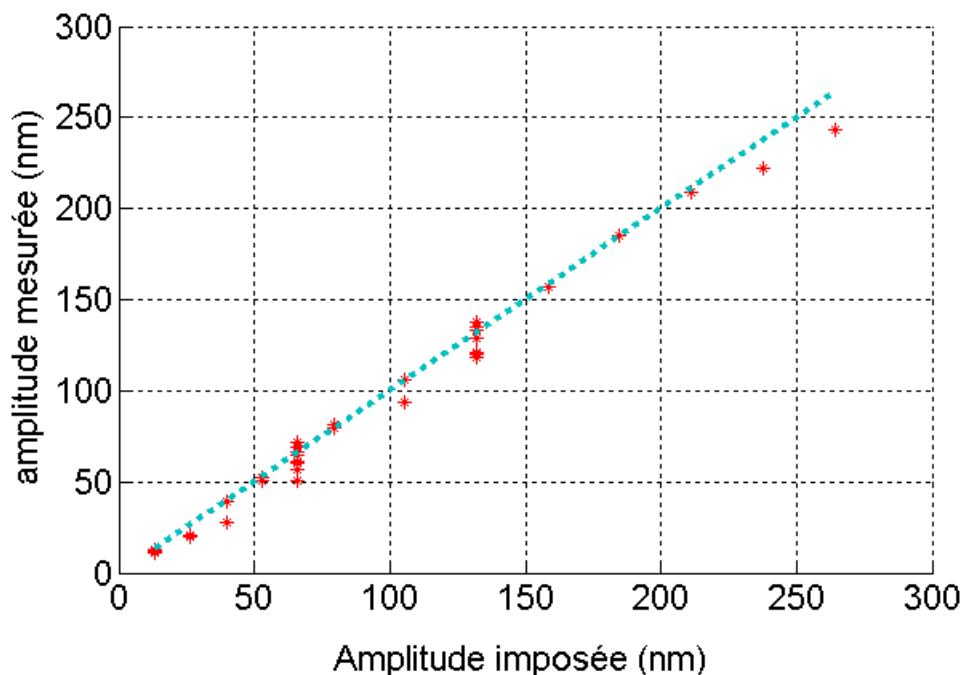


FIGURE 5.15 – Mesures d'amplitudes d'oscillations de billes de 500 nm de diamètre par analyse de Fourier. Chaque point correspond à un film. La ligne pointillée bleue représente la courbe théorique.

Limitations

Bien que les expériences de calibration montrent que la méthode permet la mesure de faibles amplitudes avec précision, de nombreuses limitations s'ajoutent dès lors que l'on l'utilise in vivo :

- *Le type de mouvement* : La mesure se base sur une simulation de l'oscillation sinusoïdale d'une gaussienne. Or, s'il est convenable d'approximer le signal de fluorescence d'une jonction à une gaussienne, l'oscillation des jonctions n'est, à ma connaissance, pas de type sinusoïdal. D'une part parce que le mouvement de la bille n'est pas une sinusoïde mais une "dents de scie", pour obtenir une vitesse constante, et d'autre part parce que la bille n'étant pas liée à la jonction, il n'y a interaction entre les deux que sur une petite portion de la trajectoire. L'imagerie des jonctions étant de piètre qualité, je n'ai pas réussi à caractériser le type de mouvement périodique auquel sont soumises les jonctions, et donc je ne peux pas connaître sa répercutions sur la mesure de l'amplitude. D'autre part, si le mouvement est similaire pour toutes les jonctions, les mesures seront entachées

d'une erreur identique, permettant leurs comparaisons.

- *Le type d'objet oscillant* : Le modèle utilisé pour établir l'abaque est unidimensionnel, les pixels ne sont qu'un segment. Cette simplification est valable pour une oscillation parallèle à la matrice des pixels et si l'objet présente une intensité uniforme (et symétrique) dans la direction perpendiculaire au mouvement (ligne, centre d'une tâche d'Airy). Par contre, si l'objet se déplace avec un angle par rapport à la matrice de pixels, elle n'est plus valable. Cela dit, si dans un tel cas la mesure d'amplitude est entachée d'une erreur supplémentaire, il est toujours possible de la comparer à une autre mesure effectuée sur une jonction présentant un angle similaire. D'autre part, il me semble possible d'établir une table de facteurs correctifs en mesurant l'amplitude à différents angles.
- *Forme de l'objet oscillant* : Le modèle 1D utilise une gaussienne; aussi, sa généralisation est une gaussienne 2D qui est une approximation valable à la tâche d'Airy que génère une bille fluorescente de 500nm. Elles constituent, à mon avis, les sondes les plus adaptées à cette méthode d'analyse. Par contre, elle n'est valable pour une jonction que dans la direction de sa largeur. La mesure d'amplitude n'est donc correcte que lorsque la jonction fluctue le long de cette direction. Dans le cas extrême d'un segment oscillant le long de sa longueur, seules ses extrémités forment une trace dans l'espace fréquentiel, le corps du segment lui est invisible car les pixels l'imageant n'enregistrent aucune fluctuation périodique d'intensité.
- *L'intensité du signal* : Bien que très sensible car basée sur une détection synchrone, le rapport signal sur bruit a un rôle prépondérant dans la détection d'une fluctuation et in fine sa mesure. Comme expliqué plus en détails dans la **section 5.3.2**, la qualité de l'image s'est avérée être notre principal obstacle à l'obtention de mesures aussi bien en qualité qu'en quantité.

5.3.2 Application et mesures in vivo

Sur toutes les expériences de bélier optique menées, seuls quelques films enregistrés présentent une imagerie de la cadhérine : GFP de qualité suffisante pour pouvoir être analysés par la méthode de détection synchrone. Au final des mesures quantitatives des amplitudes de déformations n'ont pu être menées qu'avec deux films. Au cours de ces expériences, la période du bélier est de deux secondes. Les résultats sont présentés en **figure (5.16)**.

Les images montrent que les déformations se propagent, sont répercutées à plus de deux vertex/nœuds de distance mais des mesures quantitatives n'ont pu être réalisées que pour des jonctions proches du point d'impact. Les mesures semblent indiquer une atténuation des amplitudes en fonction de son éloignement topographique i.e du nombre de vertex entre le point de mesure et le point d'impact plutôt qu'en fonction de son éloignement (**cf figure(5.16) (A)**).

L'expérience de la **figure (5.16) (B)** est un cas particulier puisque le bélier vient buter

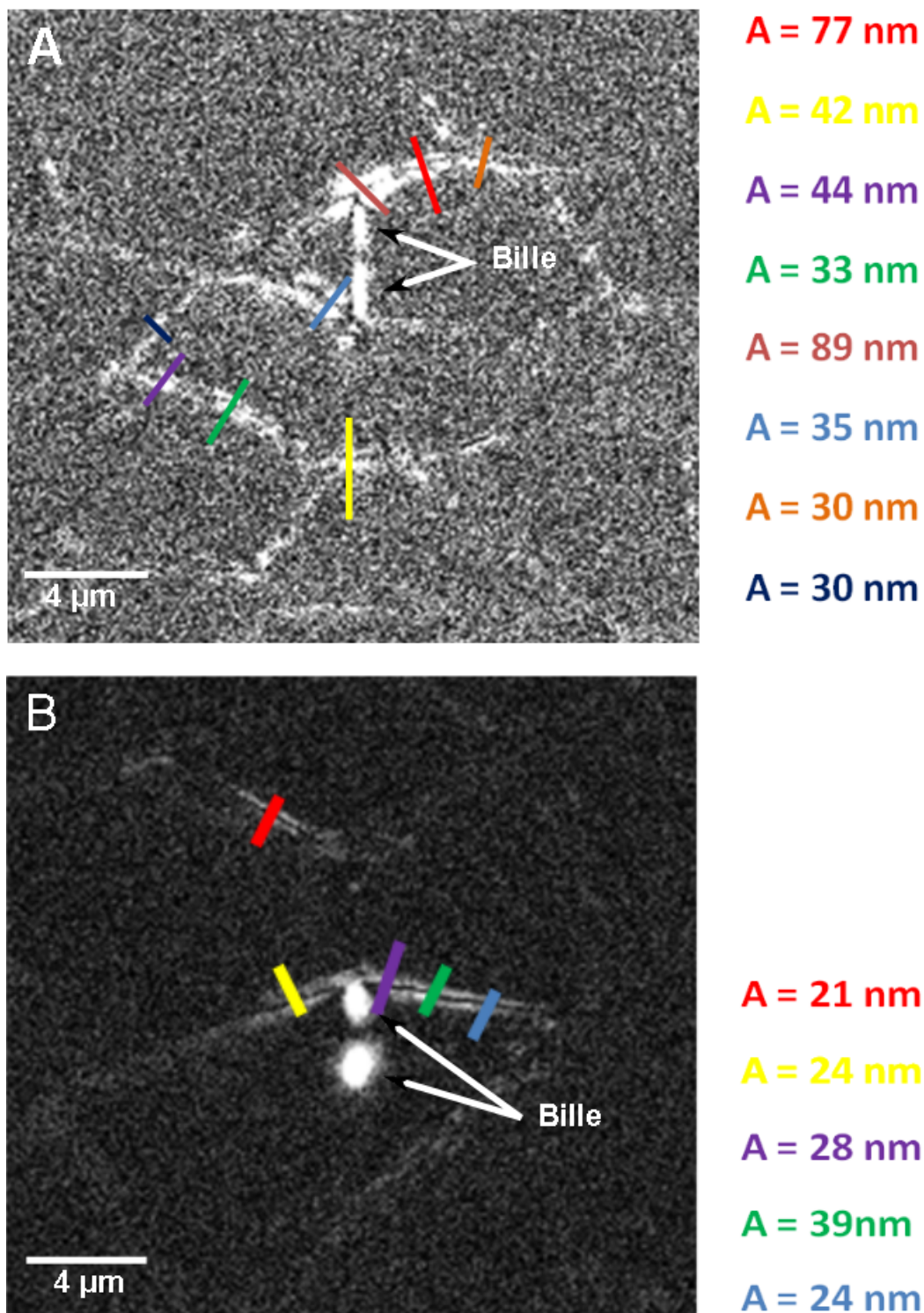


FIGURE 5.16 – Mesure de l’amplitude d’oscillations des jonctions à différents endroits du tissu à l’aide de la méthode de détection synchrone. (A) et (B) sont l’image des fluctuations des jonctions produites par un béliier optique dans deux embryons différents. Chaque mesure est locale et la couleur de la police indique la position du profil utilisé pour réaliser la mesure.

régulièrement sous un vertex colinéairement à l'orientation d'une jonction. Et on observe que celle-ci n'atténue pas la déformation locale : amplitude au point rouge similaire à celle mesurée au point jaune. Ce qui laisse suggérer soit une jonction rigide soit une jonction souple sous tension en réseau.

Pour pouvoir donner lieu à une étude de la mécanique du réseau, de très nombreuses expériences supplémentaires doivent être menées, et ce avec des images de meilleure qualité. Les deux résultats présentés ici ne constituent qu'une preuve de principe de cette mesure originale. À terme, la combinaison de la détection fréquentielle de déformation locale combinée aux manipulations de bélier optique constitue une approche faiblement invasive permettant l'étude *in vivo* de la réponse fréquentielle d'un réseau mécanique.

Chapitre 6

Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, j'ai développé et adapté des méthodes de mesures mécaniques *in vivo* au sein de l'embryon de drosophile. Mes résultats montrent qu'il est possible de réaliser des mesures de viscosité par suivi de particules uniques, de manipuler à l'aide de pinces optiques des billes au sein de l'embryon et ainsi d'obtenir des mesures de forces et de raideurs.

Le suivi de particules uniques a permis de mesurer quantitativement les viscosités intracellulaires à différentes échelles : 3.6Pa.s pour des billes de 100nm et 0.8Pa.s pour des billes de 500nm. La grande variété des viscosités mesurées reflète parfaitement la complexité du milieu biologique. Les mesures de viscosités réalisées dans des embryons où le cytosquelette est perturbé diminuent : 2 Pa.s pour les billes de 100nm et moins de 0.15 PA.s pour les billes de 500 nm. Le cytosquelette joue bien un rôle dans l'établissement de la viscosité intracellulaire.

Les pinces optiques nous ont permis de mesurer les raideurs des jonctions cellulaires : $90 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ pour les embryons sauvages et $30 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ en moyenne pour les différents phénotypes testés. On a aussi pu retrouver et commencer à quantifier l'anisotropie dorso-ventrale de tension rapportée par Rauzi *et al*¹. Les expériences de bélier optique nous ont aussi permis de mesurer quantitativement les tensions le long des jonctions. Les premières mesures varient entre 100 et 400 pN. D'autre part, dans certains cas, on a pu observer une réorganisation/fluctuation périodique du réseau, conséquence d'une série d'impacts locaux. La méthode d'analyse développée dans cette thèse permet de mesurer quantitativement l'amplitude de ces fluctuations, et devrait permettre l'étude de la réponse mécanique impulsionnelle du réseau épithélial.

Même si, à ma connaissance, ces mesures constituent une première, de nombreuses améliorations doivent être apportées.

1. RAUZI, VERANT et al. 2008.

6.1 Suivi de particules

6.1.1 Améliorations techniques.

Pour prolonger les mesures que j'ai effectuées en utilisant le suivi de particule unique, certains aspects doivent être améliorés.

Correction de la dérive.

Dans le référentiel du laboratoire, la dérive du tissu ajoute une vitesse constante au mouvement des particules suivies, et constitue une source de bruit qui peut masquer certains comportements. Aussi elle doit être corrigée. Pour cela, un algorithme de soustraction du mouvement moyen des particules a été développé, et est en phase de test. Le tissu présente une dérive globale constante, mais à l'échelle cellulaire, celle-ci peut différer en raison des réarrangements cellulaires. Ces mouvements doivent donc être quantifiés afin de s'assurer que les hétérogénéités locales sont négligeables.

La dérive ajoute aux autres mouvements diffusifs une quantité de mouvement constante : $v^2\tau^2$. Pour des trajectoires longues, le biais augmentant quadratiquement, la probabilité de masquer les types de mouvements est d'autant plus grande. Ainsi, la correction de la dérive permettrait de réaliser des films (grand τ) plus longs et donc de sonder les propriétés mécaniques à différentes échelles de temps.

Revêtement chimique des billes.

Comme l'ont montré Daniels *et al*² et Valentine *et al*³, la chimie de surface peut avoir une influence sur les interactions des particules avec leur environnement et, *in fine*, sur la mesure mécanique réalisée. Aussi, il me semble important de rendre neutres les particules suivies pour minimiser les interactions non spécifiques en question. Pour cela, on pourra utiliser le protocole proposé par Wu *et al*⁴ afin d'y attacher de manière covalente des polymères de PEG.

Amélioration de l'image biologique

La piètre qualité des images des marqueurs biologiques en épi-fluorescence et incidence a constitué l'obstacle majeur de ces travaux aussi bien pour le suivi de particules que pour certains aspects des expériences de bélier optique (mesure des forces et de propagation d'une déformation locale). Cela dit, ces deux types de manipulation ne requièrent pas le même type d'imagerie. L'imagerie des protéines d'intérêt, dans le cadre du suivi de particules, a pour but de déterminer les positions des sondes, et donc les mesures locales par rapport à une structure biologique d'intérêt (jonctions, cyto-squelette..). Et, par la

2. DANIELS, MASI et WIRTZ 2006.

3. VALENTINE *et al.* 2004.

4. WU *et al.* 2012.

suite, de pouvoir se prêter à des analyses d'images automatiques telles que la segmentation. Aussi, il n'y a pas vraiment de contrainte temporelle stricte : nul besoin d'imager avec une période d'acquisition inférieure à deux secondes. Afin d'améliorer cet aspect, je pense qu'il pourrait être très intéressant de déployer la technique de microscopie par illumination spéculaire dynamique développée par Ventalon *et al*⁵. Celle ci permet, via l'ajout d'une composante spéculaire à l'illumination et d'une phase de traitement, d'obtenir un sectionnement optique à partir d'une série d'images en champ plein (**figure (6.1)**). Non seulement nous pourrions conserver notre microscope à deux caméras, avec la souplesse d'utilisation qu'il implique, tout en obtenant des images de qualité sensiblement supérieure, mais il serait alors aussi possible d'interroger d'autres plans (plan médio-apical, ceinture d'adhésion) sans être contraint d'avoir un marquage spécifique des jonctions adhérentes (la cadhérine dans notre cas).

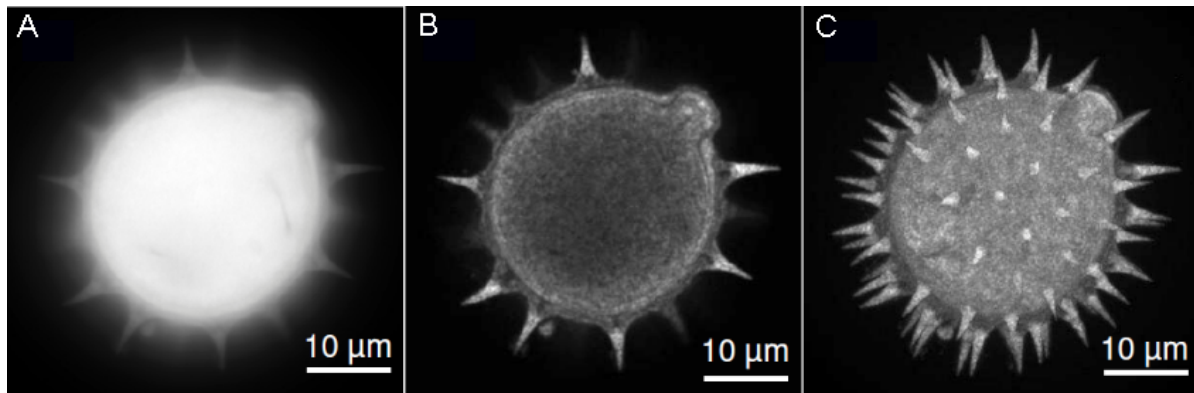


FIGURE 6.1 – Image d'un grain de pollen fluorescent en épi-fluorescence champ large (A), et en illumination spéculaire dynamique (DSI) (B). Reconstruction tri-dimensionnelle du grain de pollen à partir des images DSI. Images adaptées de (VENTALON et MERTZ 2006).

6.1.2 Mécanique et organisation du cytosquelette

Exploration des propriétés mécaniques à différentes échelles.

Les résultats obtenus avec des billes de 100 et 500 nm montrent une dépendance de la mécanique avec l'échelle spatiale sondée. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres échelles au moyen de billes de différentes tailles. Des billes de 20, 40, 200 nm sont disponibles, sachant qu'il est très difficile d'injecter des billes de diamètres supérieurs à 500 nm. On peut prévoir que certaines d'entre elles peuvent être intégrées dans différents réseaux du cyto-squelette

5. VENTALON et MERTZ 2006.

Étude de la composition du cyto-squelette sur la mécanique cellulaire.

Le suivi de particule unique est suffisamment sensible pour permettre d'étudier les changements de propriétés mécaniques dus à une variation de la composition du cyto-squelette ou à une altération spécifique. Si l'image permet une segmentation de bonne qualité, on pourrait étudier les différences mécaniques entre les jonctions antéro-portérieures et dorso-ventrales, ainsi que le réseau médio-apical (dans l'éventualité d'un sectionnement en Z possible) puisque des nombreuses études rapportent leur différence en composition⁶. Ensuite viendrait l'étude du rôle de certains composants spécifiques tels que la filamine et autre protéines de liaisons (fascin, ARP2/3, Formines...). Il serait aussi intéressant d'inhiber l'alpha-caténine dont le rôle est de lier le cortex aux jonctions adhérentes et par voie de conséquence aux cortex. Ainsi, on pourrait déterminer comment le couplage d'une cellule à ses voisines contribue à la mécanique locale.

6.2 Pinces optiques

6.2.1 Aspects techniques

Deux problèmes persistent quant à l'utilisation de la pince optique dans l'embryon : l'absence de détecteur de position, et le problème général de l'imagerie du contexte biologique.

Amélioration de l'imagerie.

La plupart des mesures réalisées avec le bélier optique sont indépendantes de l'imagerie du système biologique qu'il s'agisse des mesures de raideurs et des force. Elles nécessitent en revanche de connaître de manière fiable la distance billes-piège. L'imagerie biologique est, dans ces cas là, principalement utilisée pour caractériser la jonction que l'on sonde (**cf section (6.2.1)**). En revanche, pour ce qui est de l'étude de la relation entre mécanique globale du réseau et déformation locale à l'aide de la détections synchrone, l'image du réseau est vitale et s'est avérée être un obstacle majeur. Pour pallier ce problème, nous devons faire appel à une méthode d'imagerie rapide et à sectionnement optique. Notre choix s'est porté très tôt sur les méthodes de fluorescence où l'excitation se fait par la tranche, comme l'imagerie par feuillet de lumière (SPIM) développée par Huisken *et al*⁷. Le SPIM fonctionne sur le principe (illustré en **figure (6.2)**) suivant : l'excitation de la fluorescence est réalisée par une feuille de lumière (créée à l'aide d'une lentille cylindrique) parallèle au plan d'imagerie, et la fluorescence est collectée par un objectif perpendiculaire à l'axe d'illumination. On peut ainsi réaliser une imagerie de fluorescence plein champ aussi rapidement que le permet le signal et la caméra, tout en profitant d'un sectionnement optique intrinsèque, l'excitation de l'échantillon étant confinée au plan de la feuille de lumière. Cette technique présente en outre l'avantage de réduire de manière

6. LEVAYER, PELISSIER-MONIER et LECUIT 2011.

7. HUISKEN *et al.* 2004.

drastique la quantité de lumière utilisée pour l'illumination de l'échantillon, entraînant une baisse du photo-blanchiment et de la photo-toxicité. Ce dernier avantage permettrait de pouvoir réaliser de plus nombreuses expériences dans un même embryon.

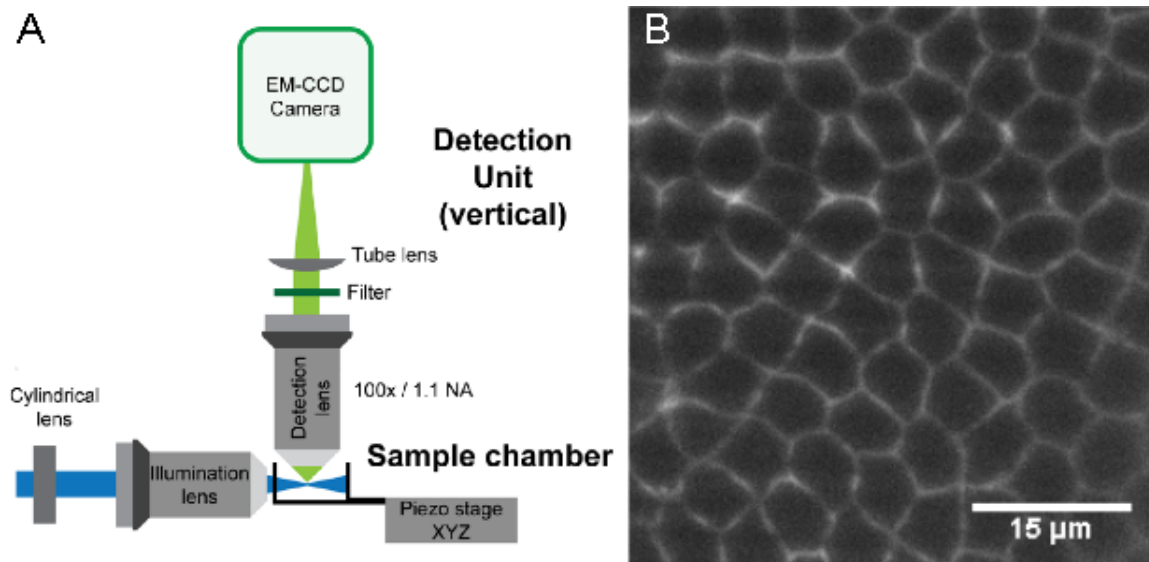


FIGURE 6.2 – (A) Schéma du montage SPIM réalisé par Claire Chardès. (B) Image d'embryon endo-cadhérine : :GFP réalisée au laboratoire par Kapil Bambardekar.

Si la grande force de cette technique se révèle être sa simplicité conceptuelle, sa mise en œuvre présente de nombreux obstacles techniques, surtout mécaniques : les optiques et surtout les objectifs sont encombrants, et trouver des optiques que l'on peut placer perpendiculairement l'un à l'autre relève souvent de la gageure. Au début de ces travaux, j'ai travaillé à la conception d'un SPIM à base de lentilles à gradient d'indice (*GRIN*) utilisé avec un objectif à forte ouverture numérique ($N.A = 1.49$) ; ce fut en vain puisque la face avant de l'objectif est trop large et obscurcit une partie de la feuille de lumière. Nous avons donc décidé de conserver notre objectif à grande ouverture numérique pour les avantages qu'il apporte en termes de localisation pour le suivi de particules. Afin d'améliorer la fréquence et la qualité des expériences de détections synchrones, nous avons très récemment mis en place des pinces optiques (dont le montage a principalement été réalisé par Kapil Bambardekar) sur le système d'illumination par la tranche construit par Claire Chardès (**figure (6.2) (A)**). Le montage n'a été terminé que très récemment et les premières expériences de béliet optique sont en cours.

Mesure de la distance bille-piège.

Pour résoudre ce problème sans avoir recours à un détecteur de position, il faut pouvoir, de manière fiable, mettre en relation/superposer les positions de la bille mesurées par l'image, et la position du laser que l'on peut déduire de la courbe de tension de commande appliquée aux galvanomètres et générée par la carte National Instrument. Pour

ce faire, il faut enregistrer les courbes de tension de commande en parallèle avec les signaux de déclenchement de la caméra (porte logique de 5V émis durant l'exposition de la puce). L'enregistrement serait réalisé via les entrées analogiques de la même carte National Instrument. Si les deux acquisitions sont synchrones (séquence d'acquisition des données déclenchée de manière externe pas la caméra), il devient alors possible de relier la position du laser (après conversion tension-distance) à la position de la bille. Cette méthode est actuellement en cours de développement et les premiers essais devraient avoir lieu bientôt.

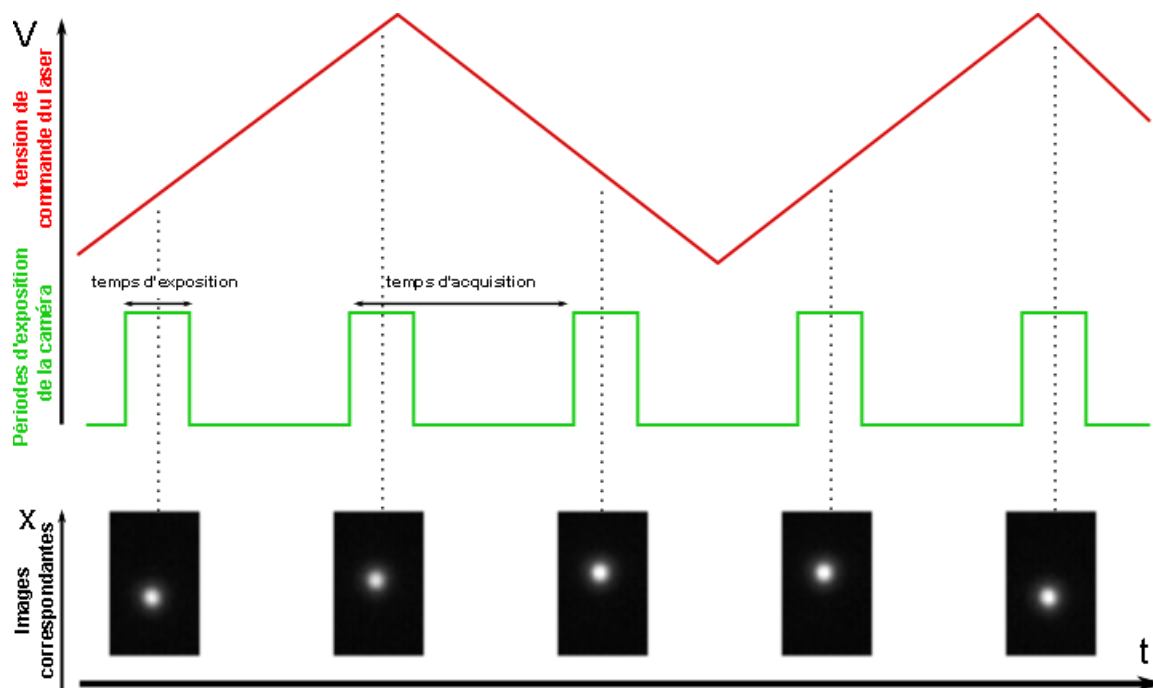


FIGURE 6.3 – Schéma représentant les différents signaux électriques émis par le système et leur relation aux images, et par conséquent aux positions, de la particule piégée.

6.3 Applications aux mesures des propriétés mécaniques

Détection synchrone

L'analyse de propagation de mouvement par détection synchrone constitue, à mon avis, le travail et la méthode les plus originaux de ma thèse. Cependant, même avec une image de qualité suffisante, les mesures quantitatives sont faussées par l'angle de la jonction, ou impossibles à faire si le sens de fluctuation est parallèle à la jonction. D'autre part, la nécessité de devoir rechercher un profil d'intensité sur un abaque fait que la mesure est par essence ponctuelle (et à mon avis difficilement automatisable). Aussi, je pense qu'il faut se limiter à la mesure des fluctuations des points particuliers du tissu : les vertex. Pour cela, deux approches sont envisageables :

- **Segmentation et identification des vertex.** Si l'imagerie permet la segmentation, on identifie les vertex et on suit leurs trajectoires dans le temps. Ensuite, on crée un film où seuls les vertex sont représentés par des gaussiennes bi-dimensionnelles, film auquel on applique l'analyse par détection synchrone.
- **Marquage spécifique des vertex.** Si l'on pouvait identifier une protéine recrutée spécifiquement au vertex, on pourrait la marquer avec une protéine fluorescente, ou y attacher une bille recouverte d'anticorps spécifiques. Ainsi on obtiendrait une vidéo des nœuds du réseau plus adaptée à l'analyse synchrone qu'un marquage général des jonctions.

Mesure de raideur et de forces.

À terme, ces deux types de mesures devraient pouvoir être réalisés à partir des images de la particule piégée et de la position du laser uniquement, donnant lieu à la première méthode permettant de sonder quantitativement la mécanique des jonctions. Les résultats obtenus montrent une forte dépendance entre les raideurs mesurées et la composition du cyto-squelette. Aussi, dans un premier temps, je pense qu'il serait nécessaire de continuer à déterminer le rôle des différents composants du cyto-squelette, aussi bien via l'étude de différentes jonctions exhibant un comportement différent dans différents tissus que par l'usage de drogues s'attaquant spécifiquement à certaines protéines.

Bibliographie

ASHKIN, et DZIEDZIC (1971).

“Optical levitation by radiation pressure”.

In : *Applied Physics Letters* 19.8, p. 283–285

(Cf. p. 58).

ASHKIN, DZIEDZIC, BJORKHOLM et CHU (1986).

“Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”.

In : *Optics letters* 11.5, p. 288–290

(Cf. p. 58).

BERTET, SULAK et LECUIT (2004).

“Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation”.

In : *Nature* 429.6992, p. 667–671

(Cf. p. 7, 8, 91).

BONNET, MARCQ, BOSVELD, FETLER, BELLAÏCHE et GRANER (2012).

“Mechanical state, material properties and continuous description of an epithelial tissue”.

In : *Journal of The Royal Society Interface* 9.75, p. 2614–2623

(Cf. p. 18).

BOUZIGUES, (2006).

“Dynamique de récepteurs uniques du GABAA dans le cône de croissance : rôle dans la détection de signaux de guidage”.

Thèse de doct. Université Paris-Diderot-Paris VII

(Cf. p. 53).

BRODLAND, CONTE, CRANSTON, VELDHUIS, NARASIMHAN, HUTSON, JACINTO, ULRICH, BAUM et MIODOWNIK (déc. 2010).

“Video force microscopy reveals the mechanics of ventral furrow invagination in *Drosophila*.” eng.

In : *Proc Natl Acad Sci U S A* 107.51, p. 22111–22116

(Cf. p. 19).

CAVEY, RAUZI, LENNE et LECUIT (2008).

“A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin”.

In : *Nature* 453.7196, p. 751–756

(Cf. p. 3, 11).

CHENG, (2008).

“Formula for the viscosity of a glycerol-water mixture”.

In : *Industrial & engineering chemistry research* 47.9, p. 3285–3288

(Cf. p. 56).

CROCKER, et HOFFMAN (2007).

“Multiple-Particle Tracking and Two-Point Microrheology in Cells”.

In : *Methods in cell biology* 83, p. 141–178

(Cf. p. 26).

CROCKER, VALENTINE, WEEKS, GISLER, KAPLAN, YODH et WEITZ (2000).

“Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials”.

In : *Physical Review Letters* 85.4, p. 888–891

(Cf. p. 17).

DANIELS, MASI et WIRTZ (2006).

“Probing Single-Cell Micromechanics In Vivo : The Microrheology of *C. elegans* Developing Embryos”.

In : *Biophysical journal* 90.12, p. 4712–4719

(Cf. p. 18, 32, 79, 108).

DE VRIES, KRENN, VAN DRIEL et KANGER (mar. 2005).

“Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells.” eng.

In : *Biophysical Journal* 88.3, p. 2137–2144

(Cf. p. 21, 22).

DÉBARRE, SUPATTO, FARGE, MOULIA, SCHANNE-KLEIN et BEAUREPAIRE (2004).

“Velocimetric third-harmonic generation microscopy : micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos”.

In : *Optics letters* 29.24, p. 2881–2883

(Cf. p. 64).

DELANOË-AYARI, RIEU et SANO (déc. 2010).

“4D traction force microscopy reveals asymmetric cortical forces in migrating Dictyostelium cells.” eng.

In : *Phys Rev Lett* 105.24, p. 248103

(Cf. p. 16).

DESPRAT, GUIROY et ASNACIOS (2006).

“Microplates-based rheometer for a single living cell”.

In : *Review of scientific instruments* 77.5, p. 055111–055111

(Cf. p. 16).

DIMITRIADIS, HORKAY, MARESCA, KACHAR et CHADWICK (2002).

“Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope”.

In : *Biophysical Journal* 82.5, p. 2798–2810

(Cf. p. 15).

EINSTEIN, (1956).

Investigations on the Theory of the Brownian Movement.

Courier Dover Publications

(Cf. p. 47).

- FIOLKA, BELYAEV, EWERS et STEMMER (2008).
“Even illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using laser light”.
In : *Microscopy research and technique* 71.1, p. 45–50
(Cf. p. 38).
- FOTY, FORGACS, PFLEGER et STEINBERG (1994).
“Liquid properties of embryonic tissues : measurement of interfacial tensions”.
In : *Physical review letters* 72.14, p. 2298–2301
(Cf. p. 16).
- GARDEL, SHIN, MACKINTOSH, MAHADEVAN, MATSUDAIRA et WEITZ (2004).
“Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks”.
In : *Science* 304.5675, p. 1301–1305
(Cf. p. 11).
- GIESEMANN, SCHWARZ, NAWROTZKI, BERHÖRSTER, ROTHKEGEL, SCHLÜTER, SCHRA-
DER, SCHINDELIN, MENDEL, KIRSCH et al. (2003).
“Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin,
and Mena : a possible link to the microfilament system”.
In : *The Journal of neuroscience* 23.23, p. 8330–8339
(Cf. p. 52).
- GOLEY, et WELCH (2006).
“The ARP2/3 complex : an actin nucleator comes of age”.
In : *Nature reviews Molecular cell biology* 7.10, p. 713–726
(Cf. p. 8).
- GOUESBET, MAHEU et GREHAN (1988).
“Light scattering from a sphere arbitrarily located in a Gaussian beam, using a Brom-
wich formulation”.
In : *JOSA A* 5.9, p. 1427–1443
(Cf. p. 61).
- HARADA, et ASAKURA (1996).
“Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime”.
In : *Optics communications* 124.5, p. 529–541
(Cf. p. 59).
- HARRIS, WILD et STOPAK (1980).
“Silicone rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion”.
In : *Science* 208.4440, p. 177–179
(Cf. p. 16).
- HOCHMUTH, WILES, EVANS et MCCOWN (1982).
“Extensional flow of erythrocyte membrane from cell body to elastic tether. II. Expe-
riment”.
In : *Biophysical journal* 39.1, p. 83–89
(Cf. p. 94).
- HOWARD, (1997).
“Molecular motors : structural adaptations to cellular functions”.
In : *Nature* 389.6651, p. 561–567
(Cf. p. 10).

HOWARD, (2001).

“Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton”.

In :

(Cf. p. 94).

HUISKEN, SWOGER, DEL BENE, WITTBRODT et STELZER (2004).

“Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy”.

In : *Science* 305.5686, p. 1007–1009

(Cf. p. 110).

HUISSTEDE, WERF, BENNINK et SUBRAMANIAM (2005).

“Force detection in optical tweezers using backscattered light”.

In : *Optics Express* 13.4, p. 1113–1123

(Cf. p. 64, 66).

HUMPHREY, DUGGAN, SAHA, SMITH et KÄS (2002).

“Active fluidization of polymer networks through molecular motors”.

In : *Nature* 416.6879, p. 413–416

(Cf. p. 10).

ISHIHARA, SUGIMURA, COX, BONNET, BELLAICHE et GRANER (2013).

“Comparative study of non-invasive force and stress inference methods in tissue”.

In : *arXiv preprint arXiv :1301.4298*

(Cf. p. 19, 86).

KOENDERINK, DOGIC, NAKAMURA, BENDIX, MACKINTOSH, HARTWIG, STOSSEL et WEITZ (2009).

“An active biopolymer network controlled by molecular motors”.

In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.36, p. 15192–15197

(Cf. p. 11, 19).

KOESTLER, AUINGER, VINZENZ, ROTTNER et SMALL (2008).

“Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front”.

In : *Nature cell biology* 10.3, p. 306–313

(Cf. p. 9, 10).

KRIEG, ARBOLEDA-ESTUDILLO, PUECH, KÄFER, GRANER, MÜLLER et HEISENBERG (2008).

“Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish”.

In : *Nature cell biology* 10.4, p. 429–436

(Cf. p. 15, 89).

KUNWAR, TRIPATHY, XU, MATTSON, ANAND, SIGUA, VERSHININ, MCKENNEY, CLARE, MOGILNER et al. (2011).

“Mechanical stochastic tug-of-war models cannot explain bidirectional lipid-droplet transport”.

In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.47, p. 18960–18965

(Cf. p. 26, 27).

KUSUMI, SAKO et YAMAMOTO (1993).

“Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells.”

In : *Biophysical Journal* 65.5, p. 2021

(Cf. p. 51, 53).

LAPRISE, et TEPASS (2011).

“Novel insights into epithelial polarity proteins in *Drosophila*”.

In : *Trends in cell biology* 21.7, p. 401–408

(Cf. p. 32).

LE GOFF, AMBLARD et FURST (2001).

“Motor-driven dynamics in actin-myosin networks”.

In : *Physical review letters* 88.1, p. 018101

(Cf. p. 10).

LEE, PANORCHAN, HALE, KHATAU, KOLE, TSENG et WIRTZ (2006).

“Ballistic intracellular nanorheology reveals ROCK-hard cytoplasmic stiffening response to fluid flow”.

In : *Journal of cell science* 119.9, p. 1760–1768

(Cf. p. 30).

LEIDEL, LONGORIA, GUTIERREZ et SHUBEITA (2012).

“Measuring molecular motor forces in vivo : Implications for tug-of-war models of bidirectional transport”.

In : *Biophysical journal* 103.3, p. 492–500

(Cf. p. 64).

LEPTIN, et GRUNEWALD (1990).

“Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*”.

In : *Development* 110.1, p. 73–84

(Cf. p. 7).

LEVAYER, PELISSIER-MONIER et LECUIT (2011).

“Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis”.

In : *Nature cell biology* 13.5, p. 529–540

(Cf. p. 110).

LIU, CHENG, SONEK, BERNS, CHAPMAN et TROMBERG (1995).

“Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers.”

In : *Biophysical journal* 68.5, p. 2137

(Cf. p. 63).

MA, ANGARITA, FRIERSON, SHELDON et HUTSON (2011).

“Measuring the viscosity of embryonic epithelia *in vivo* by magnetic tweezers”.

In :

APS March Meeting 2011

(Cf. p. 29).

- MARTIN, FORSTNER et KÄS (2002).
“Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking”.
In : *Biophysical Journal* 83.4, p. 2109–2117
(Cf. p. 51).
- MASON et WEITZ (fév. 1995).
“Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids.” eng.
In : *Phys Rev Lett* 74.7, p. 1250–1253
(Cf. p. 48).
- MILLS, STONE, ERHARDT et PITTMAN (1998).
“Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation”.
In : *The Journal of cell biology* 140.3, p. 627–636
(Cf. p. 94).
- MULLER, et WIESCHAUS (1996).
“armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*”.
In : *Journal of Cell Biology* 134.1, p. 149–164
(Cf. p. 11).
- NAHMIAS, et ODDE (2002).
“Analysis of radiation forces in laser trapping and laser-guided direct writing applications”.
In : *Quantum Electronics, IEEE Journal of* 38.2, p. 131–141
(Cf. p. 61, 93).
- NEUMAN, et BLOCK (2004).
“Optical trapping”.
In : *Review of scientific instruments* 75.9, p. 2787–2809
(Cf. p. 62, 64, 67).
- NEUMAN, CHADD, LIOU, BERGMAN et BLOCK (1999).
“Characterization of Photodamage to *Escherichia coli* in Optical Traps”.
In : *Biophysical Journal* 77.5, p. 2856–2863
(Cf. p. 63).
- PETERMAN, GITTES et SCHMIDT (2003).
“Laser-induced heating in optical traps”.
In : *Biophysical journal* 84.2, p. 1308–1316
(Cf. p. 63).
- PURCELL, (1977).
“Life at low Reynolds number”.
In : *Am. J. Phys* 45.1, p. 3–11
(Cf. p. 47).
- QIAN, SHEETZ et ELSON (1991).
“Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems.”
In : *Biophysical Journal* 60.4, p. 910
(Cf. p. 48).

- QUINTIN, GALLY et LABOUESSE (2008).
“Epithelial morphogenesis in embryos : asymmetries, motors and brakes”.
In : *Trends in Genetics* 24.5, p. 221–230
(Cf. p. 4, 10).
- RADMACHER, FRITZ, KACHER, CLEVELAND et HANSMA (1996).
“Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope”.
In : *Biophysical Journal* 70.1, p. 556–567
(Cf. p. 15).
- RAUZI, LENNE et LECUIT (2010).
“Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling”.
In : *Nature* 468.7327, p. 1110–1114
(Cf. p. 80).
- RAUZI, VERANT, LECUIT et LENNE (2008).
“Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis”.
In : *Nature Cell Biology* 10.12, p. 1401–1410
(Cf. p. 18, 86, 91, 107).
- SAXTON, (1997).
“Single-particle tracking : the distribution of diffusion coefficients.”
In : *Biophysical journal* 72.4, p. 1744
(Cf. p. 51).
- SERGÉ, BERTAUX, RIGNEAULT et MARGUET (2008).
“Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes”.
In : *Nature Methods* 5.8, p. 687–694
(Cf. p. 44, 46).
- SHIM, CHA, BYUN et CHOE (1999).
“Size control of polystyrene beads by multistage seeded emulsion polymerization”.
In : *Journal of applied polymer science* 71.13, p. 2259–2269
(Cf. p. 28).
- SIMMONS, FINER, CHU et SPUDICH (1996).
“Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap”.
In : *Biophysical Journal* 70.4, p. 1813–1822
(Cf. p. 67, 69).
- SVOBODA, et BLOCK (1994).
“Biological applications of optical forces.” eng.
In : *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, p. 247–285
(Cf. p. 27, 60).
- TEPASS, et HARTENSTEIN (1994).
“The Development of Cellular Junctions in the *Drosophila* Embryo”.
In : *Developmental biology* 161.2, p. 563–596
(Cf. p. 11).

TSENG, KOLE et WIRTZ (2002).

“Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology.”

In : *Biophysical journal* 83.6, p. 3162

(Cf. p. 32).

TURNER, et MAHOWALD (1977).

“Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis : II. Gastrulation and segmentation”.

In : *Developmental biology* 57.2, p. 403–416

(Cf. p. 6).

VALENTINE, PERLMAN, GARDEL, SHIN, MATSUDAIRA, MITCHISON et WEITZ (2004).

“Colloid surface chemistry critically affects multiple particle tracking measurements of biomaterials”.

In : *Biophysical journal* 86.6, p. 4004–4014

(Cf. p. 17, 28, 32, 33, 108).

VENTALON, et MERTZ (2006).

“Dynamic speckle illumination microscopy with translated versus randomized speckle patterns”.

In : *Opt. Express* 14.16, p. 7198–7209

(Cf. p. 109).

WIRTZ, (2009).

“Particle-tracking microrheology of living cells : principles and applications.” eng.

In : *Annu Rev Biophys* 38, p. 301–326

(Cf. p. 29).

WU, HALE, CHEN, LEE, TSENG et WIRTZ (2012).

“High-throughput ballistic injection nanorheology to measure cell mechanics”.

In : *Nature protocols* 7.1, p. 155–170

(Cf. p. 29, 30, 32, 108).

YONEMURA, WADA, WATANABE, NAGAFUCHI et SHIBATA (2010).

“ α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development”.

In : *Nature cell biology* 12.6, p. 533–542

(Cf. p. 12).