

*Présentation orale*

**Forces generated during actin-based propulsion: A  
direct measurement by micromanipulation**

*Y. Marcy, J. Prost, MF. Carlier, C. Sykes*

*Cours de Vincent Croquette  
« Interface Physique-Biologie »*

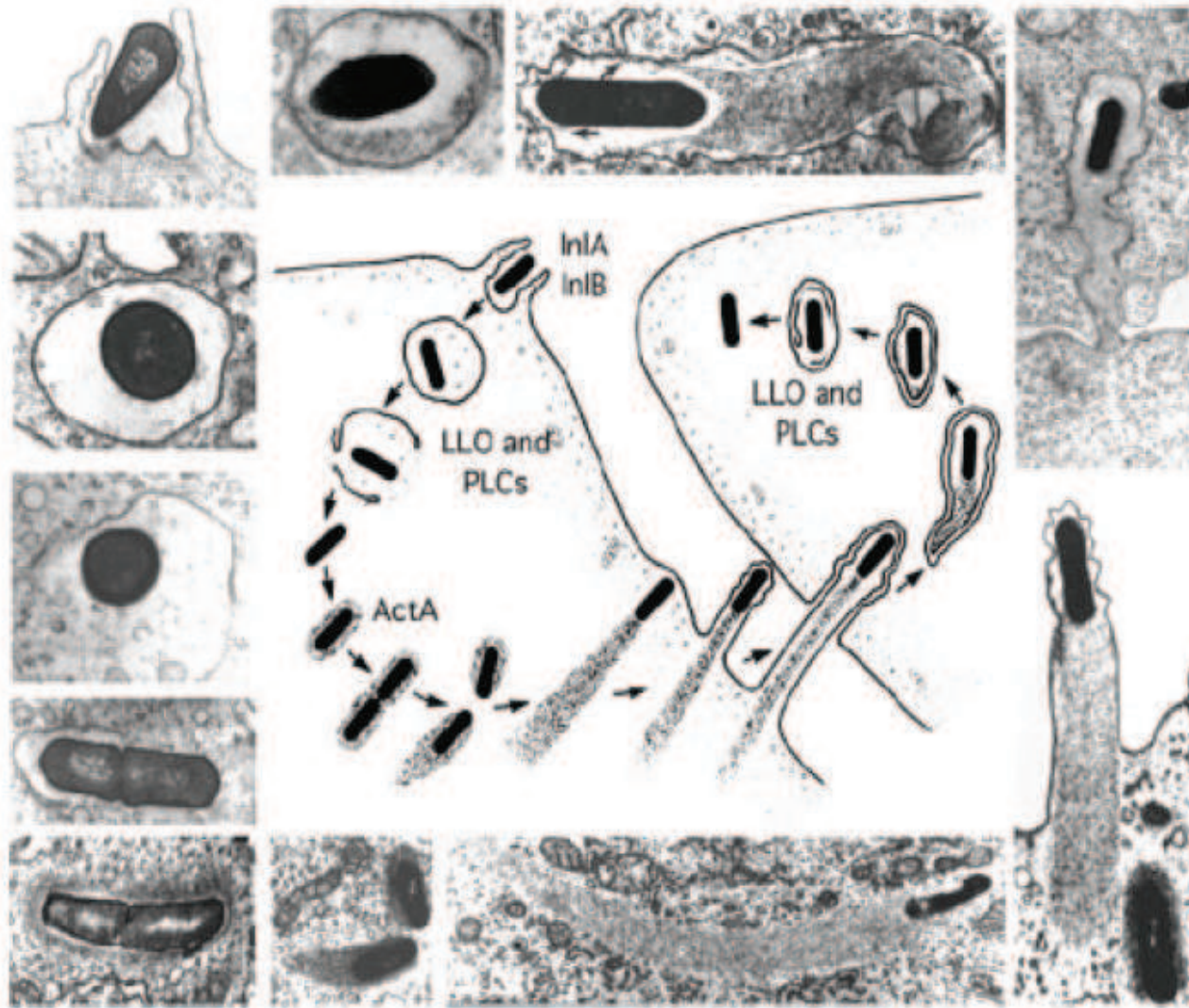
***Master 2<sup>ème</sup> année – Physique Théorique - ENS Ulm  
Benjamin Topper***

# Sommaire

- Pourquoi
  - étudier la motilité de la Listéria
  - étudier la relation force-vitesse
  - résultats contradictoires
- Comment
  - biomimétisme
  - micromanipulation
  - résultats
- Points forts & Limites

# Listeria monocytogenes I

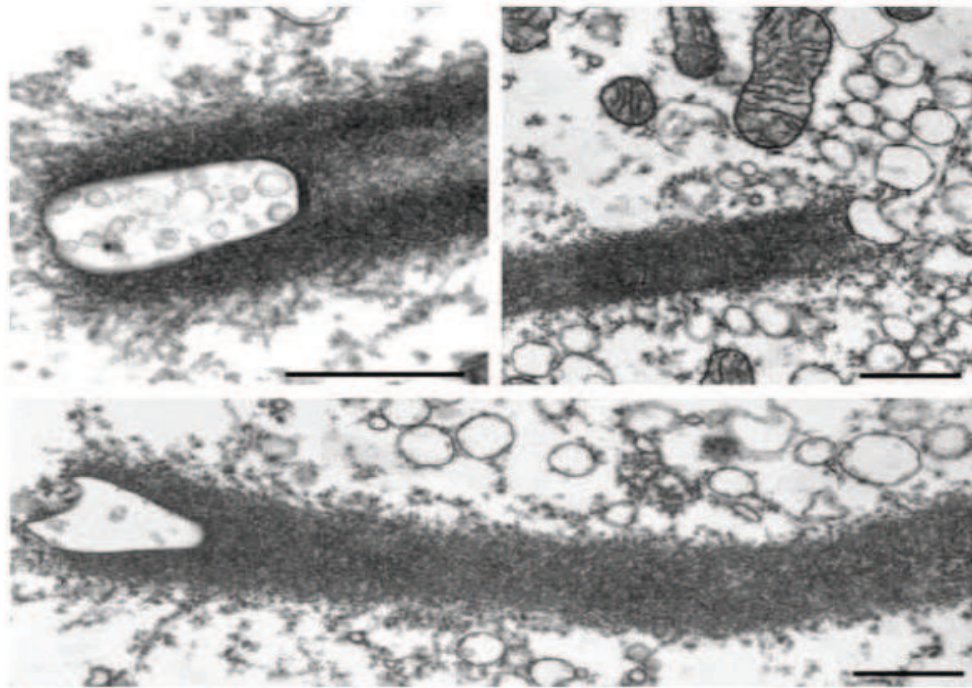
- Agent infectieux qui peut se retrouver dans toute la chaîne alimentaire (fromages au lait cru par exemple) qui l'ont fait connaître du grand public.
- Une fois ingérée, elle se lie aux cellules hôtes grâce à une protéine exprimée à sa surface appelée *internaline*.
- Une fois internalisée, elle lyse le phagosome l'entourant puis prolifère. Si elle a échappé au système immunitaire avant la première internalisation, elle échappera ensuite aux défenses de l'organisme.



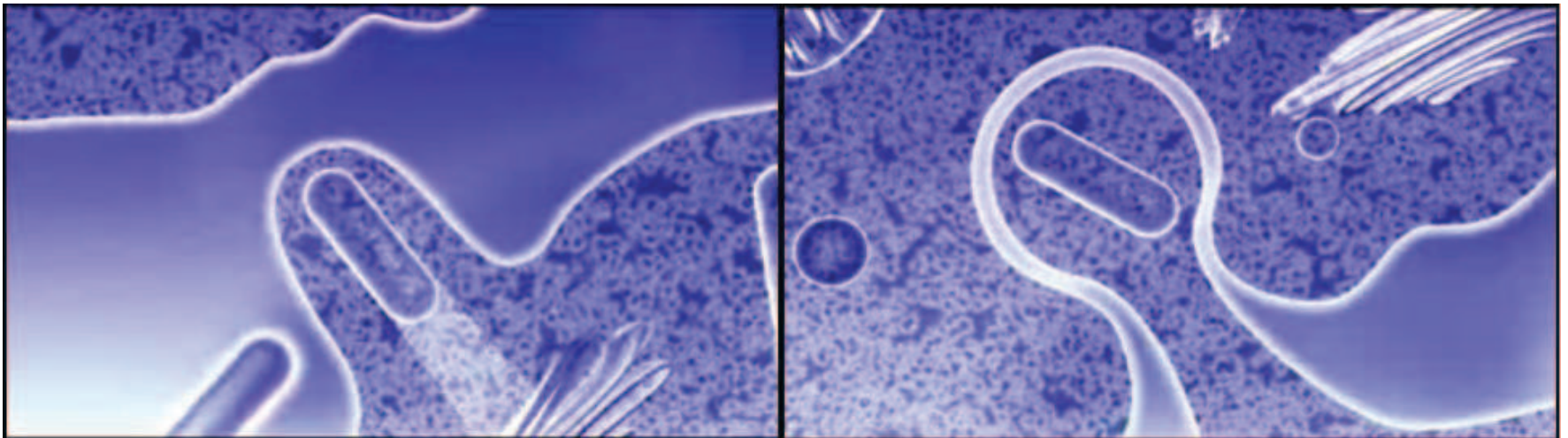
Cycle d'infection de *Listeria monocytogenes*. Les images entourant le schéma sont des coupes de microscopie électronique représentant les différentes étapes. D'après (Portnoy, Auerbuch et al. 2002)

# Listeria monocytogenes II

- Propulsion par polymérisation : phénomène répandu, par exemple dans le transport de certains organites cellulaires. D'un point de vue évolutif : phénomène de convergence (bactérie *Shigella* responsable de dysenteries, virus vaccine de la variole, pinosomes...) = > efficacité.
- Nuage d'actine autour d'elle qui se polarise et donne naissance à une structure en comète qui la propulse dans la cellule : détournement de la machinerie biochimique de la cellule hôte. Exprime à sa surface une protéine appelée ActA, nécessaire et suffisante à la motilité qui se lie au complexe responsable de la polymérisation locale
- Force suffisante pour déformer la membrane cellulaire pour permettre la phagocytose.



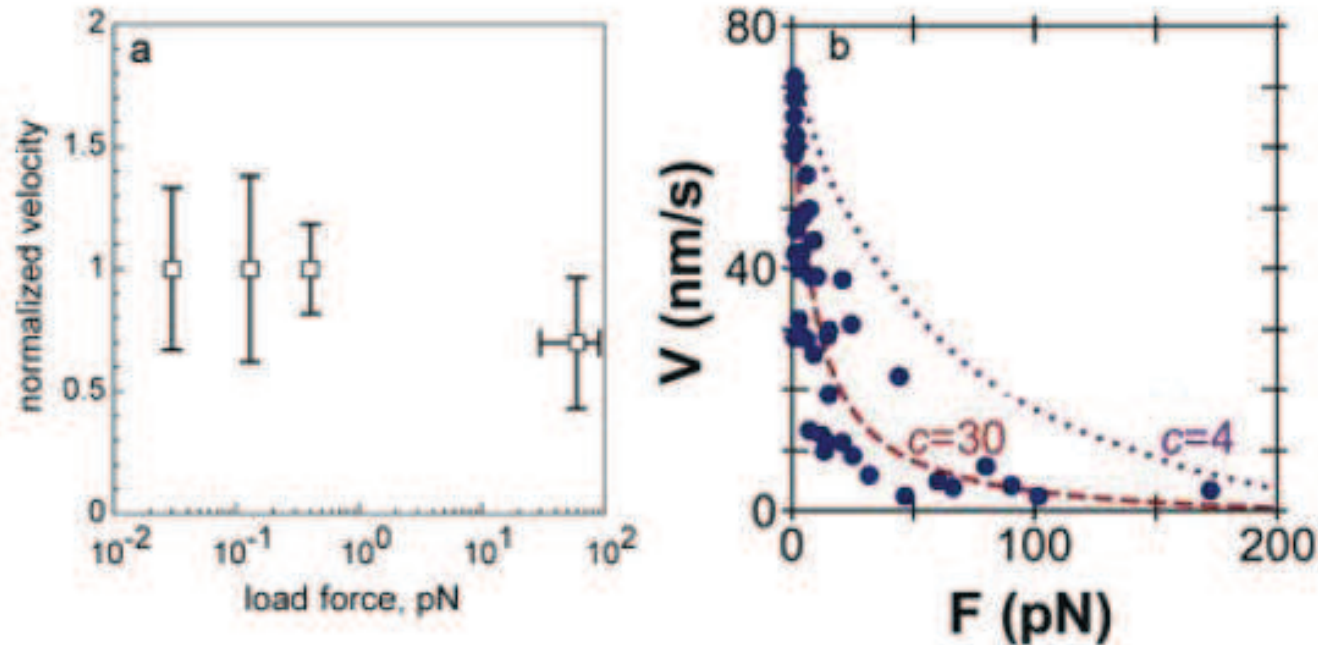
coupes de microscopie électronique d'endosomes associés à des comètes d'actine.  
Barre de calibration 500nm. D'après (Taunton, Rowning et al. 2000).



# Relation Force-Vitesse

- Caractéristique essentielle de tout moteur.
- Capacité qu'a la propulsion par polymérisation d'actine à soutenir son mouvement lorsqu'elle rencontre un obstacle.
- Pression de sélection puisqu'elle est essentielle pour la dissémination de la bactérie *Listeria monocytogenes*.
- Rôle essentiel dans la falsification des modèles (cliquet thermique, élastique, ....)

# Résultats contradictoires



Relations force vitesse mesurées par variation de la viscosité.

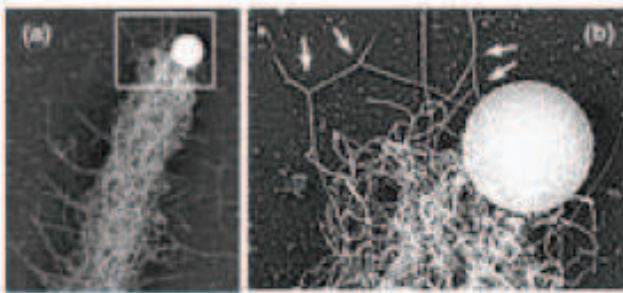
a: Wiesner et coll. b: McGrath et coll.

Résultats pour l'instant contradictoires : vitesse constante chez Wiesner alors que forte décroissance chez McGrath sur l'intervalle 0-50pN par mesures indirectes (viscosité). Updhyaya et al (2003), Giardini et al (2003) indiquent une force de propagation de l'ordre de plusieurs nN.  
=> Nécessité d'une mesure directe.

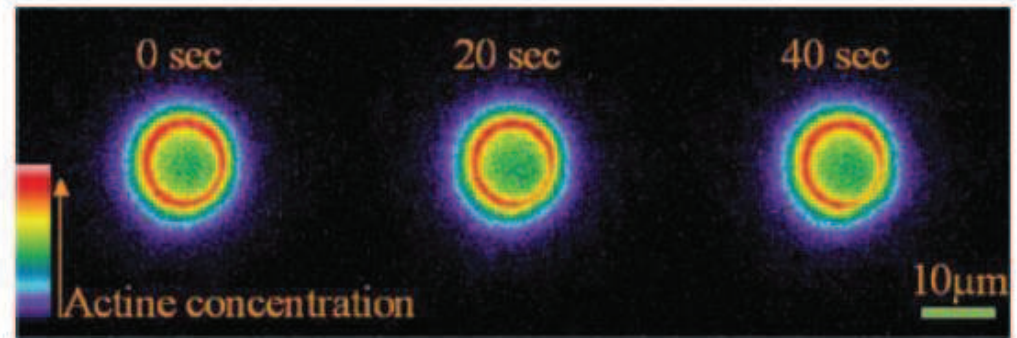


# Biomimétisme

- Billes de polystyrène recouvertes d'ActA
  - géométrie du support de polymérisation (diamètre de la bille, ...)
  - contrôle des paramètres de surface (densité d'activateurs, ...)

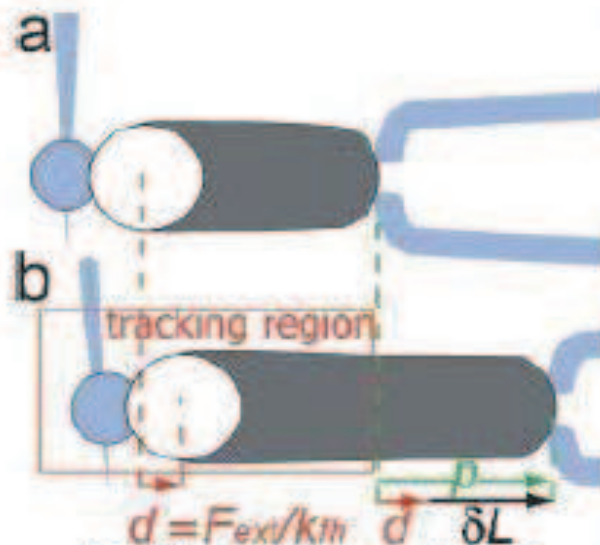
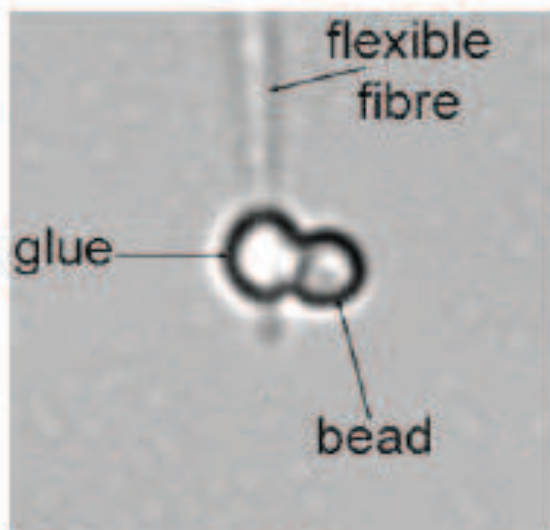


microscopie électronique de billes adsorbées avec ActA dans des extraits cellulaires.



brisure de symétrie d'une bille recouverte d'ActA placée dans des extraits.

# Micromanipulation



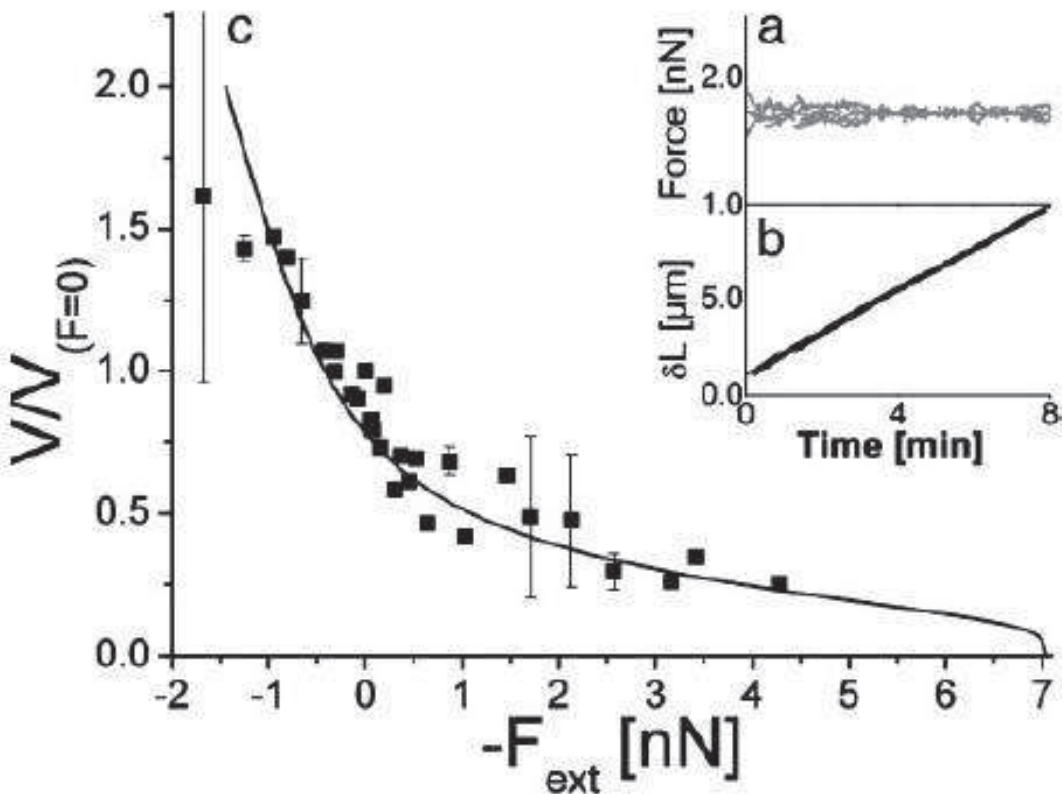
Experimental scheme and image. (a) The actin comet (dark gray) grows from the flexible handle bead (white) and is held at its end by the comet holding micropipette. (b) The micropipette is moved to the right of the figure. Consequently, the bead is submitted to a force  $F$  proportional to the flexible handle rigidity,  $k_{fh}$ , and the deflection of the fiber  $d$ , measured by tracking the bead position in the tracking region. The distance,  $\delta L$ , is the lengthening of the comet, and it corresponds to the traveled distance of the micropipette minus the deflection.

# Mesures possibles

Trois types de sollicitation possibles :

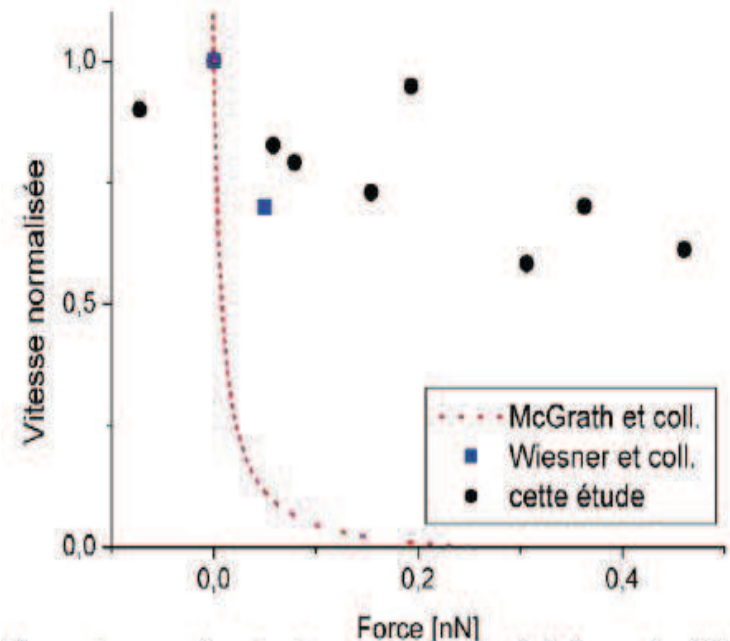
- Croissance contre un obstacle
- Force imposée : permet d'obtenir chaque point d'un diagramme force vitesse du système.
- Vitesse imposée : micropipette déplacée à vitesse constante pour imposer une vitesse au système (grandes vitesses et transition vers une instabilité dynamique pour des vitesses plus faibles).

# Résultats I



Force-velocity diagram. (a and b) Typical measurement for one point of the force-velocity diagram. Force (a) and comet lengthening  $\delta L$  (b) as a function of time. The force is set to 1.7 nN (pushing force). The bursts are caused by small feedback-loop oscillations. The velocity is obtained from the slope of the  $\delta L$  versus time plot:  $V = 1.1 \pm 0.15 \mu\text{m}/\text{min}$  (the zero force-velocity for this handle is  $V_{F=0} = 2.0 \mu\text{m}/\text{min}$ ). (c) Force-velocity relation. The velocity is normalized by the velocity at zero force measured for each flexible handle

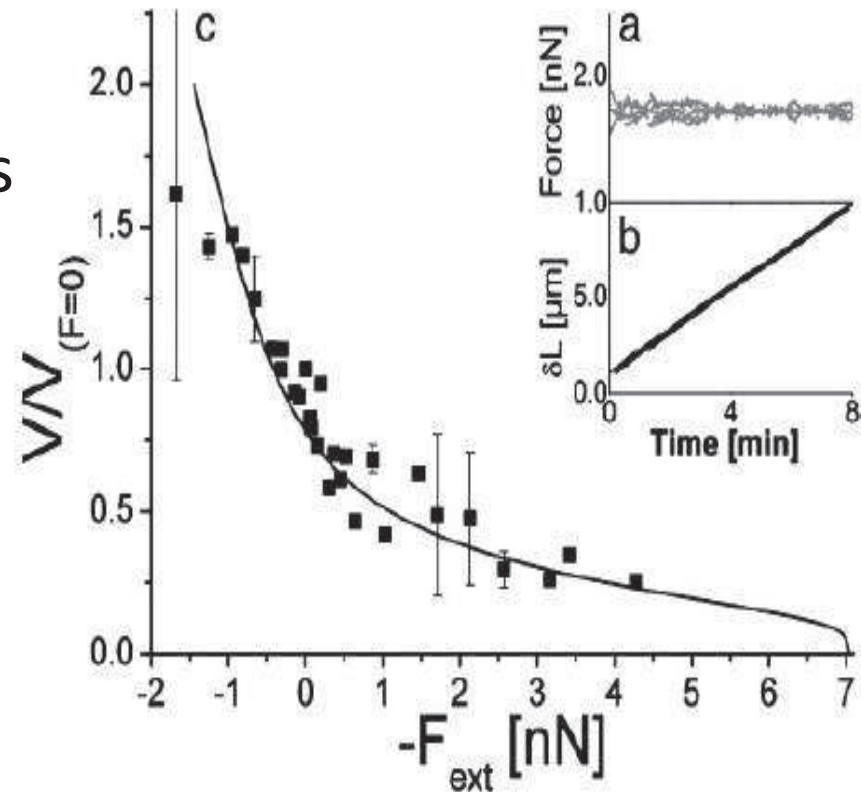
Accord avec Wiesner mais pas avec McGrath (zoom sur la région  $[-0.1; 0.5] \text{nN}$  :



Comparaison avec les autres travaux sur un zoom de la force entre  $-0.1$  et  $0.5 \text{nN}$ .

# Résultats II

- Décroissance linéaire en « pull ». Rupture du lien bille-comète vers 2.8 nN
- Décroissance qui diminue plus lentement en « push ». Force pour arrêter la propulsion : environ 7 nN par extrapolation (20% de  $V_0$  à 4.3 nN).
- Accord avec le modèle élastique (Gerbal, Chaikin et al. 2000) avec les simplifications de (Prost 2001).



Force-velocity diagram. (a and b) Typical measurement for one point of the force-velocity diagram. Force (a) and comet lengthening  $\delta L$  (b) as a function of time. The force is set to 1.7 nN (pushing force). The bursts are caused by small feedback-loop oscillations. The velocity is obtained from the slope of the  $\delta L$  versus time plot:  $V = 1.1 \pm 0.15 \mu\text{m}/\text{min}$  (the zero force-velocity for this handle is  $V_{F=0} = 2.0 \mu\text{m}/\text{min}$ ). (c) Force-velocity relation. The velocity is normalized by the velocity at zero force measured for each flexible handle

# Points forts et limites

- Analyse insensible aux modèles microscopiques qui ne constituent qu'une condition aux limites de l'analyse élastique : pas nécessaire de tenir compte de l'aspect microscopique de la polymérisation.
- Etudes simplifiées (approximations telles que symétrie sphérique, contrainte radiale homogène sur toute la bille,...) en bon accord avec les résultats expérimentaux.

# Points forts et limites

- Instabilité aux grandes vitesses en « pull » et rupture comète/bille.
- Etude ou prise en compte du flambage élastique en « push »
- Pas encore de mesure directe du point d'arrêt (simple extrapolation).

# Sources & Références

- Thèse de Yann Marcy «La propulsion par polymérisation d'actine sondée par micromanipulation »
- Thèse de Hakim Boukellal «Propulsion par l'actine : Génération de force »
- DNAtube :  
<http://www.dnatube.com/video/2506/Intrace-Ilular-Listeria-Infection>