

Physique des objets biologiques: du nanomètre au micron.

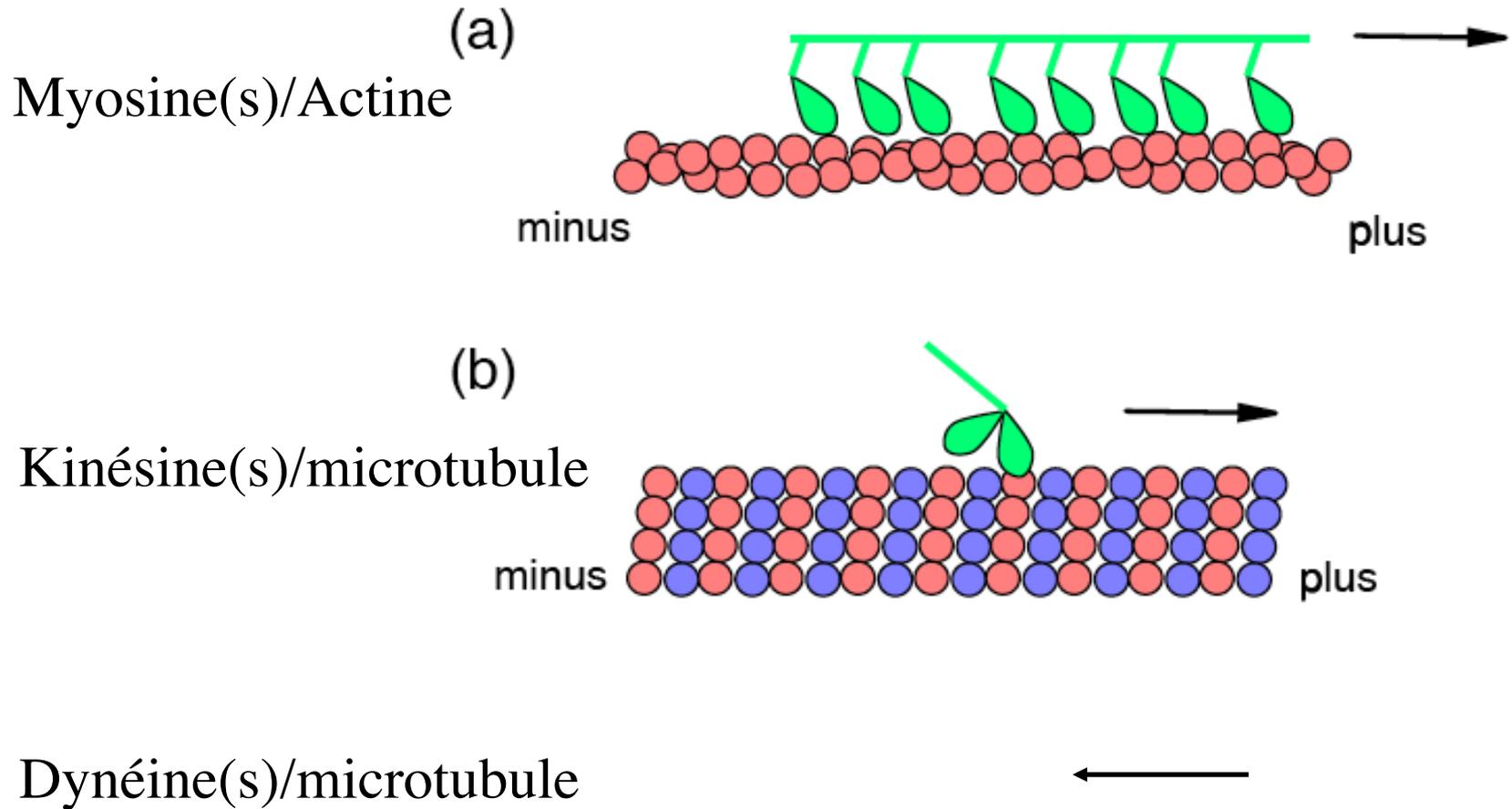
Rémi Monasson

Moteurs Moléculaires (linéaires)

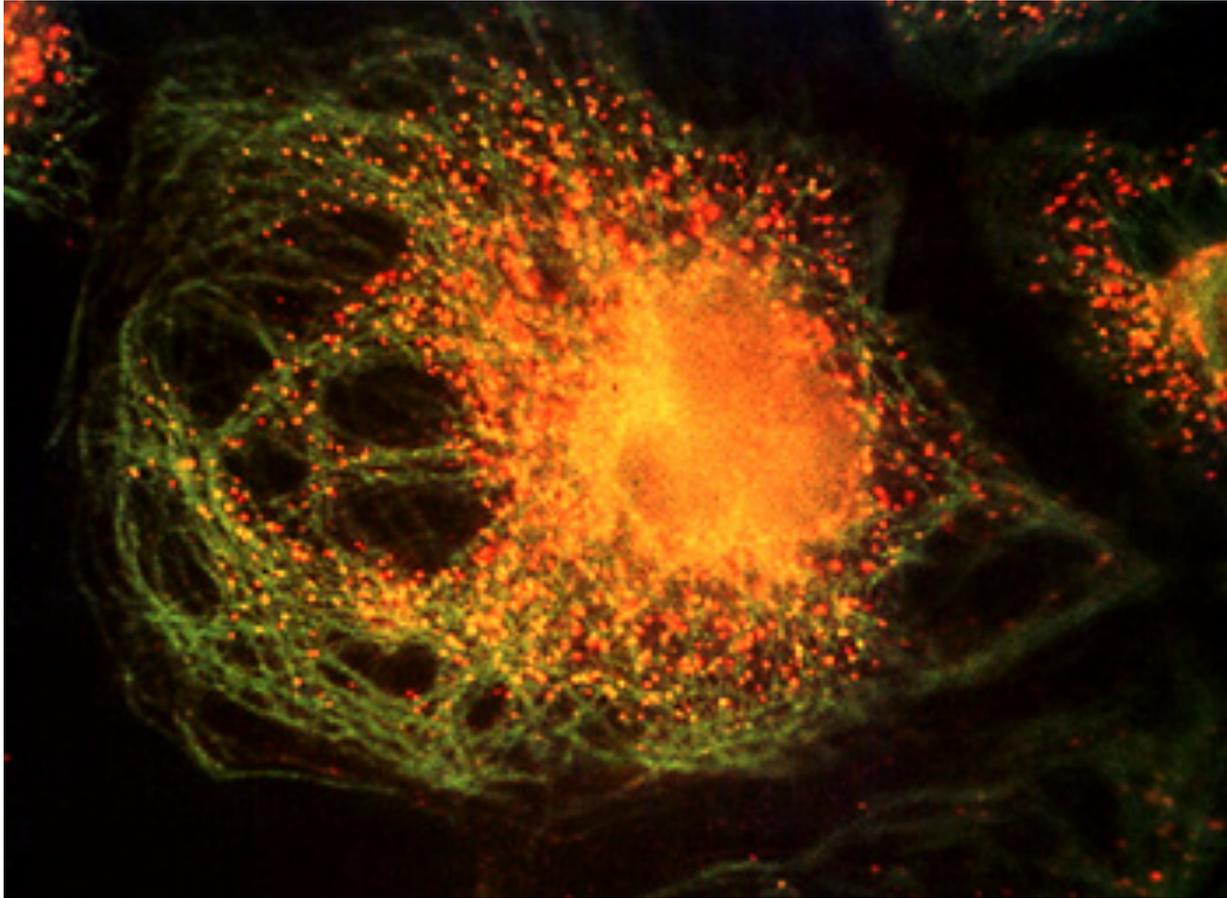
- 1 Présentations: couples moteurs/filaments
- 2 Micromanipulations in vitro
- 3 Des moteurs chez Brown ?
- 4 Moteurs chimiques isothermes
- 5 Perspectives

1- Présentations

Couples moteurs/filaments

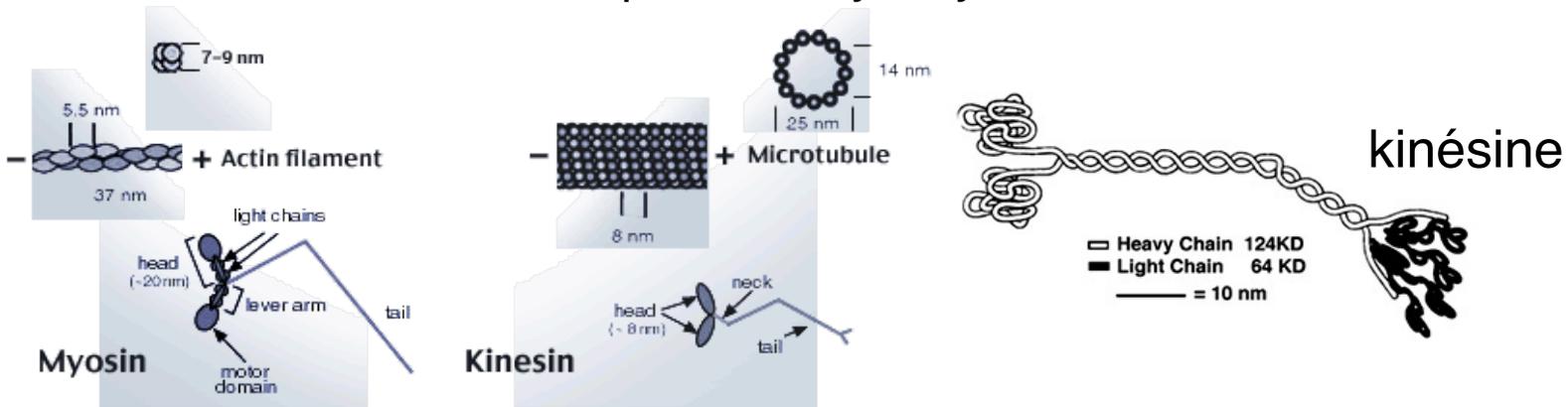


Moteurs sur filaments

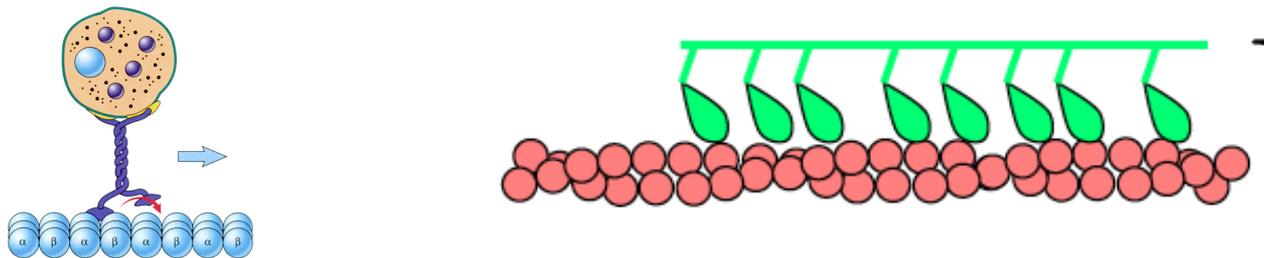


Eléments communs

- Une tête nanométrique(ou deux) qui interagit avec le filament, qui peut fixer l'ATP, et où celui-ci peut être hydrolysé



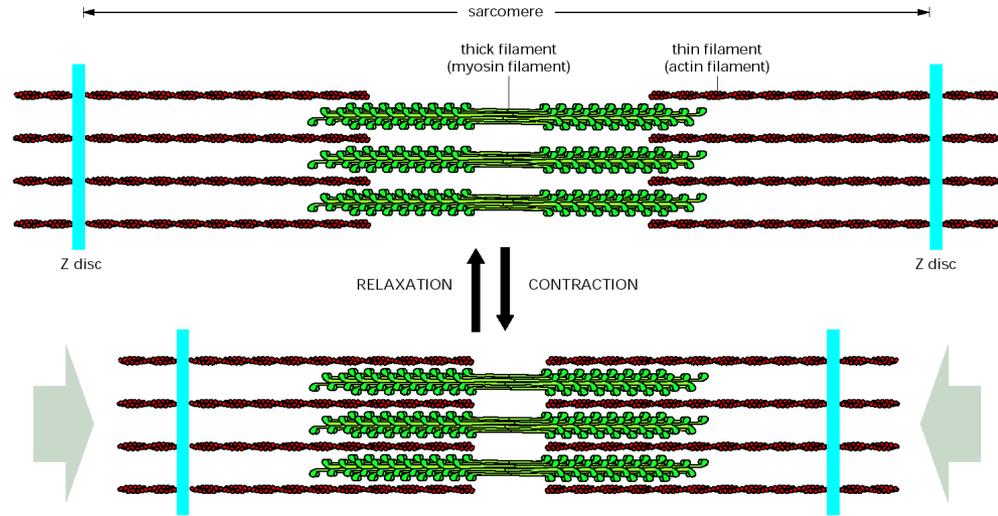
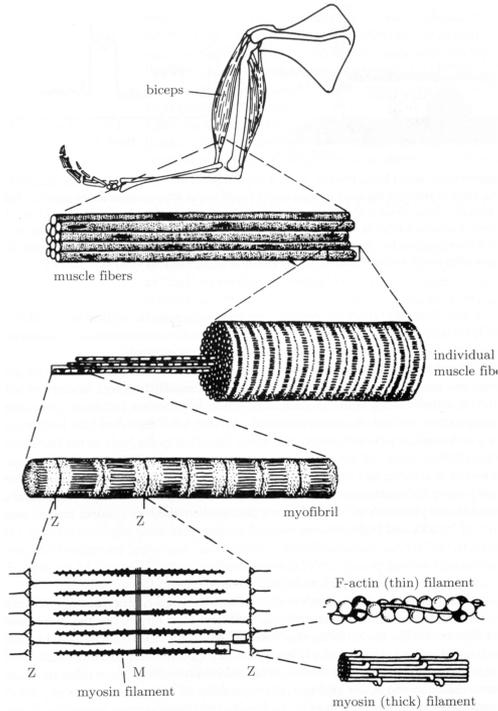
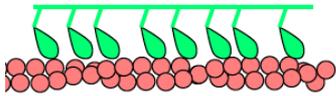
- Une queue qui peut s'associer à l'objet à transporter, où s'associer à d'autres queues pour faire des complexes ou des fibres



- La polarité des filaments fixe la direction du mouvement pour un moteur donné

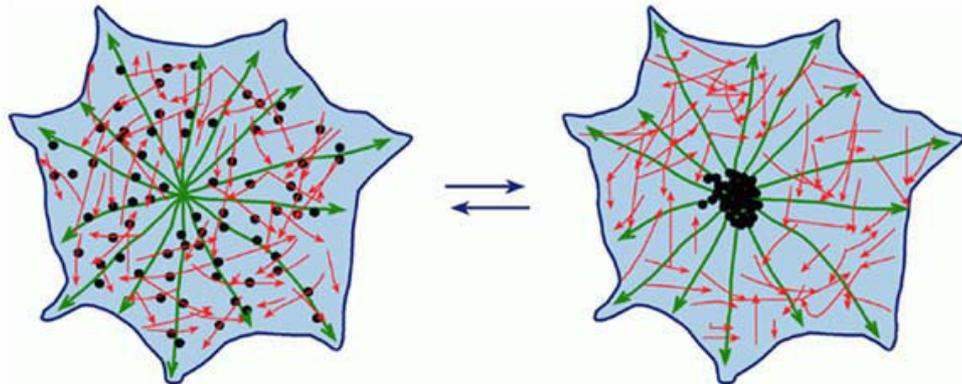
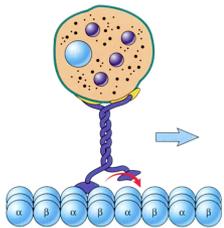
Fonctions multiples

muscles



Contraction de $1\mu\text{m} \times 100000 = 10\text{ cm}$

transport dirigé



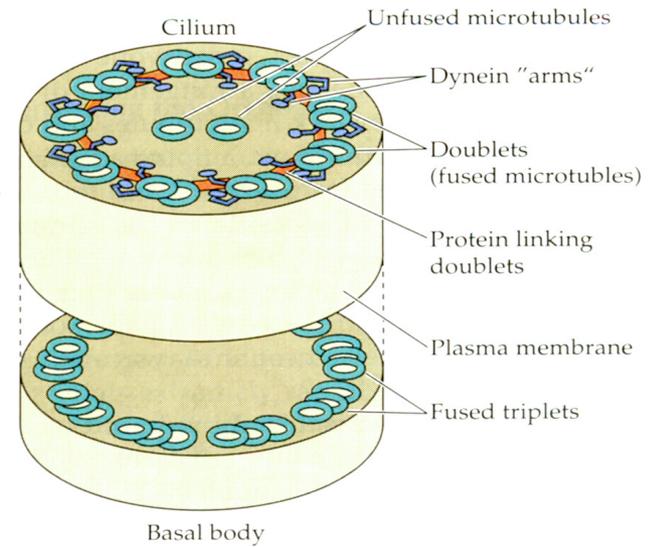
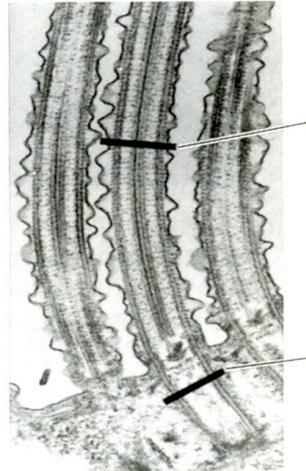
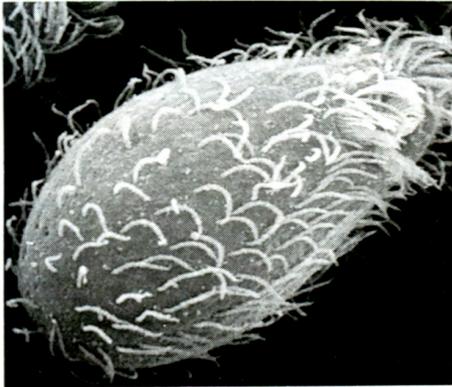
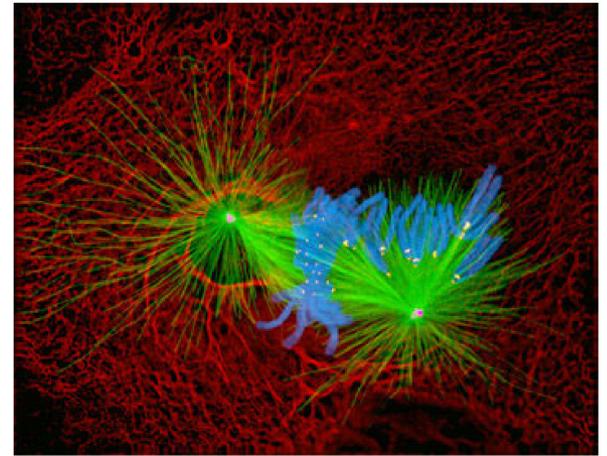
Dispersed melanosomes

Aggregated melanosomes

Et encore

Organisation

Motilité/propulsion

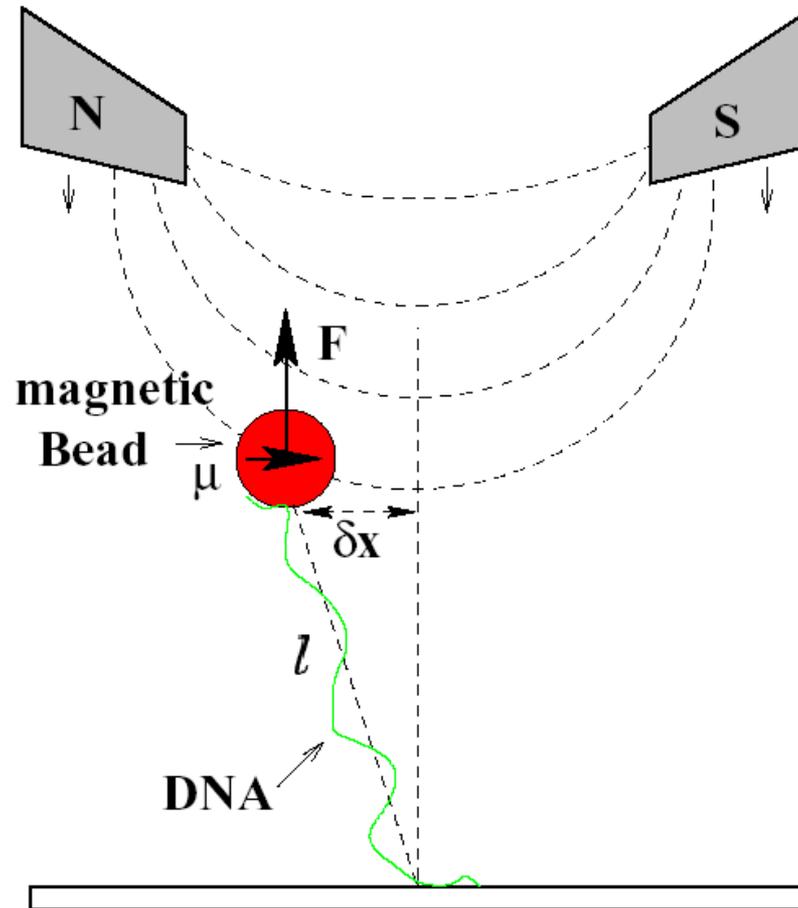


250 nm

2- Micromanipulations in vitro

(avec pièges optiques et magnétiques)

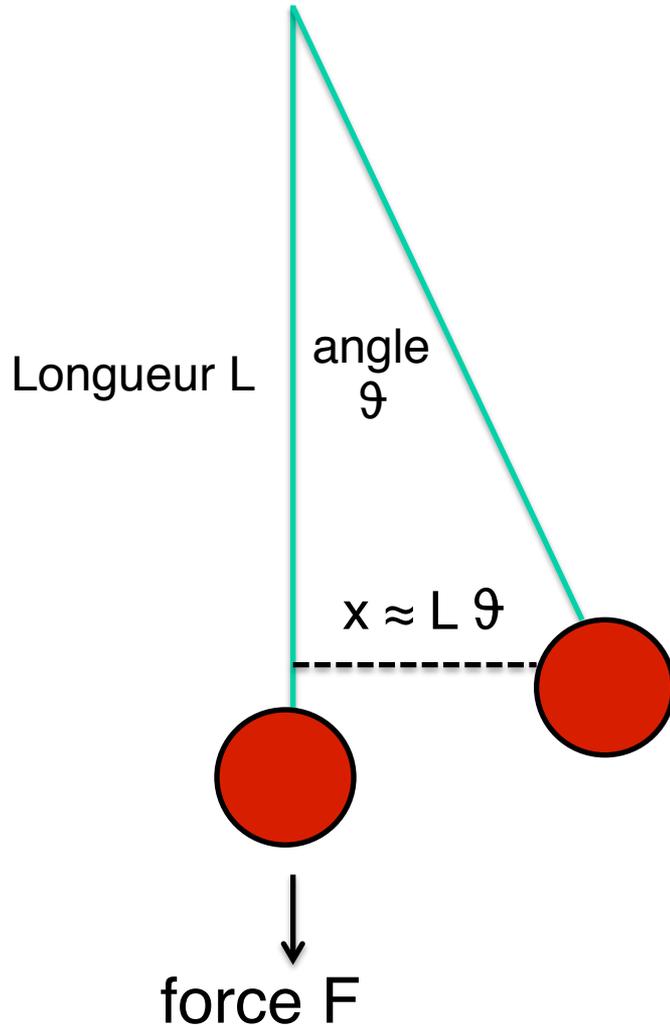
« Piège » magnétique



Le gradient du champ est uniforme sur des distances d'ordre micrométriques
-> force constante

Comment mesure-t-on la force?

Pendule (inversé !)



Energie :

$$E = - F L \cos \vartheta$$
$$= F L \vartheta^2 / 2 + \text{cst}$$

Equipartition :

$$\langle E \rangle = k_B T / 2 \quad \text{donc}$$

$$F L \langle \vartheta^2 \rangle = k_B T$$

$$\rightarrow F = \frac{k_B T L}{\langle x^2 \rangle}$$

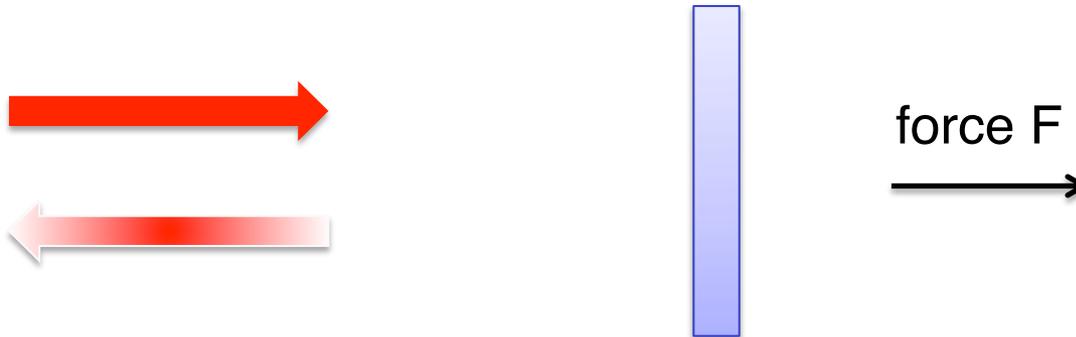
Piège optique : Exercer des forces à l'aide de la lumière

Milieu d'index n_1

($H_2O=1.33$)

Faisceau puissant de lumière
Puissance = P (en W)

(e.g. laser proche infrarouge)



Force de radiation due à la **réflexion** par un **miroir parfait** ?

Puissance = Force x Vitesse

-> $F = 2 n_1 P/c$ ($P=100$ mW, $n_1=1.33$) -> $F \cong 900$ pN

En général, $F = Q n_1 P/c$ avec $Q \leq 2$

Piège optique : Exercer des forces à l'aide de la lumière

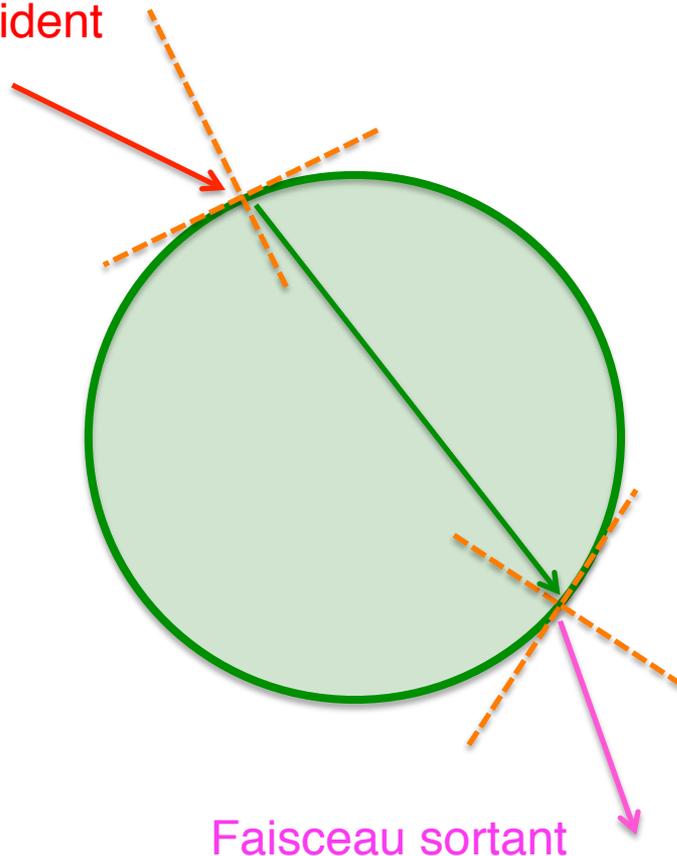
Milieu d'index n_1
Bille d'index $n_2 > n_1$

(H₂O=1.33)
(polystyrène=1.6)

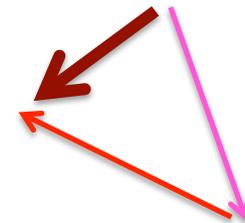
-> réfraction!!

Loi de Snell-Descartes : $n_1 \sin \vartheta_1 = n_2 \sin \vartheta_2$

Faisceau incident



Force exercée sur le faisceau
par la bille :



Force exercée par le faisceau
sur la bille :

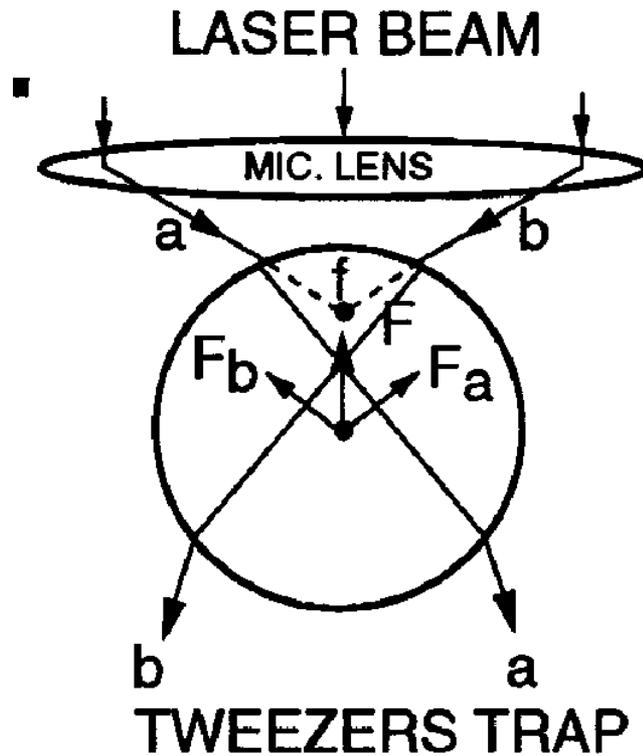


Piège optique : Exercer des forces à l'aide de la lumière

Milieu d'index n_1
Bille d'index $n_2 > n_1$

($H_2O=1.33$)
(polystyrène=1.6)

-> réfraction!!

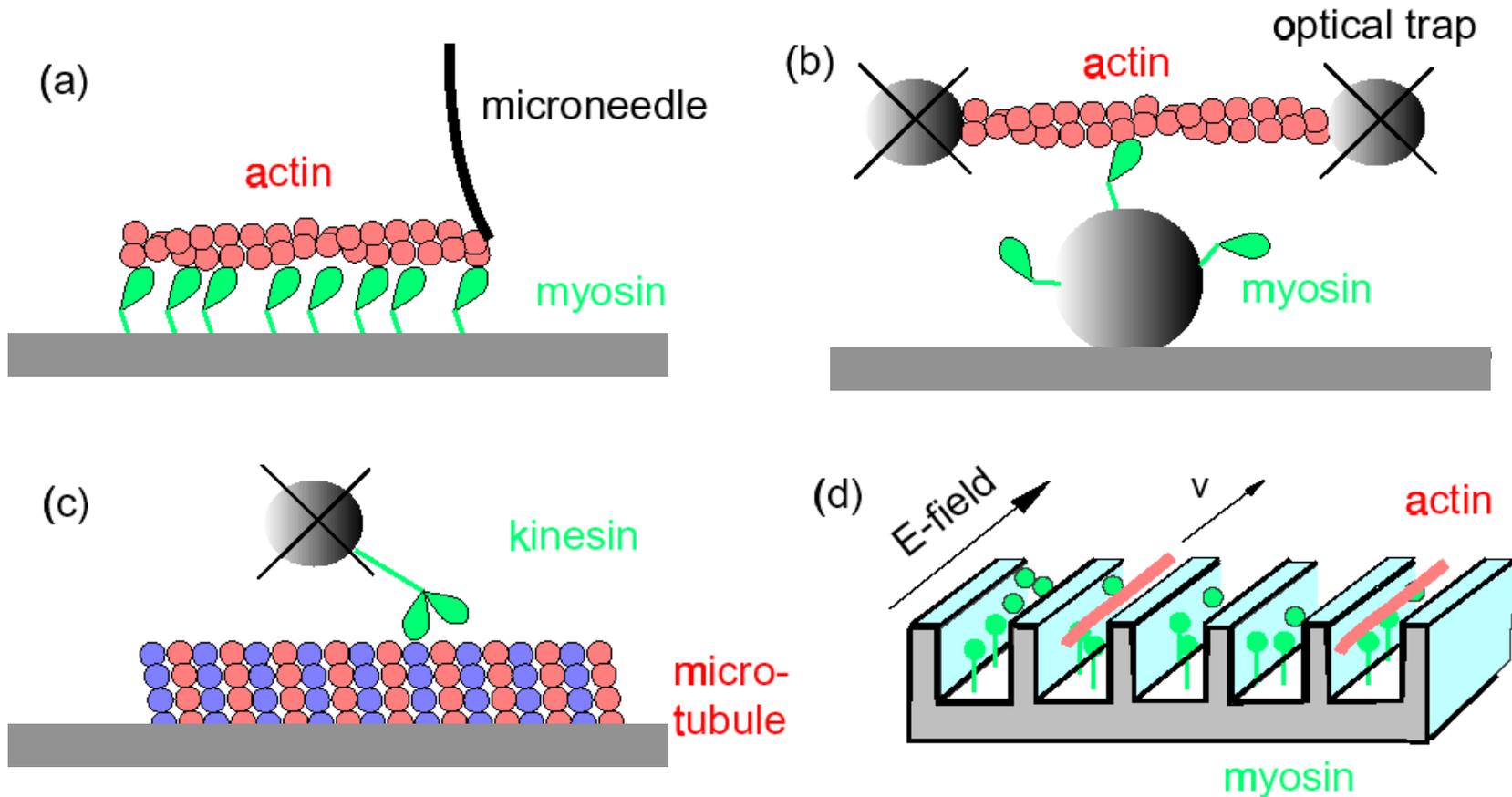


- Force opposée à la réflexion
- Également force de rappel vers l'axe du réseau, cf. déplacement latéral
- Ordre de grandeur billes SiO_2 ou polystyrène de $d \sim 1 \mu m$,
 $P \cong 300 \text{ mW}$,

$$F_{\max} \cong 100 \text{ pN}$$

Micromanipulation: observation + action

« Motility assay » (a,d): « tapis » de moteurs fixes, filament bouge
« Bead assay » (c): filament fixe, moteur+bille bougent



Processivité

moteur labile: se déplace ou pousse...
et après un certain temps se détache

une notion opérationnelle:

« **duty ratio** » = fraction du temps attaché

Tête de kinésine ~ 50% du temps

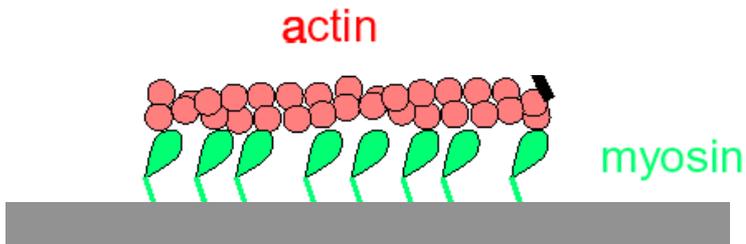
-> kinésine à deux têtes très processive

Tête de myosine ~ 10% du temps

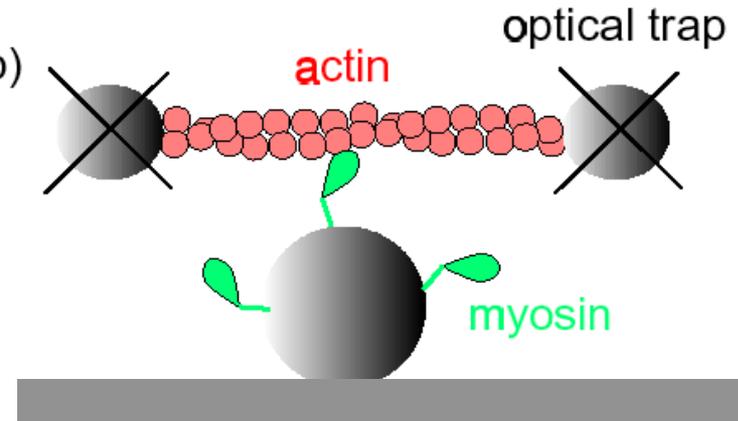
plus de ~10 moteurs par filament
pour mouvement continu

Expériences spéciales
pour un seul moteur

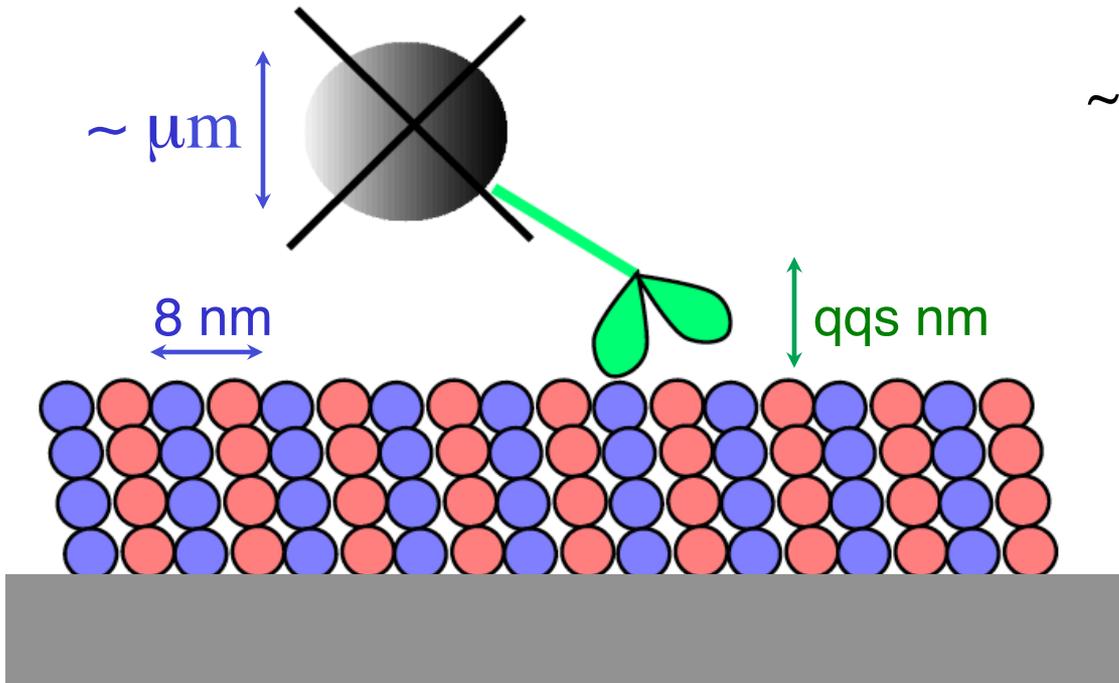
(a)



(b)



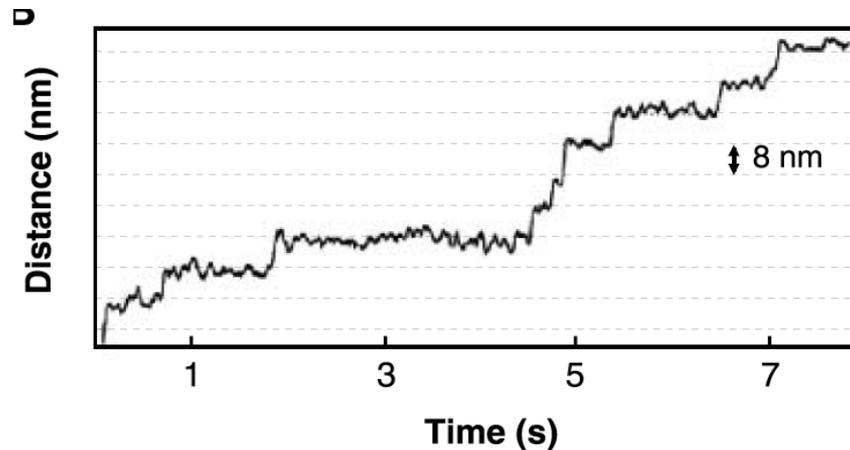
Kinésine sur microtubule



~ 1 kinésine au plus par bille

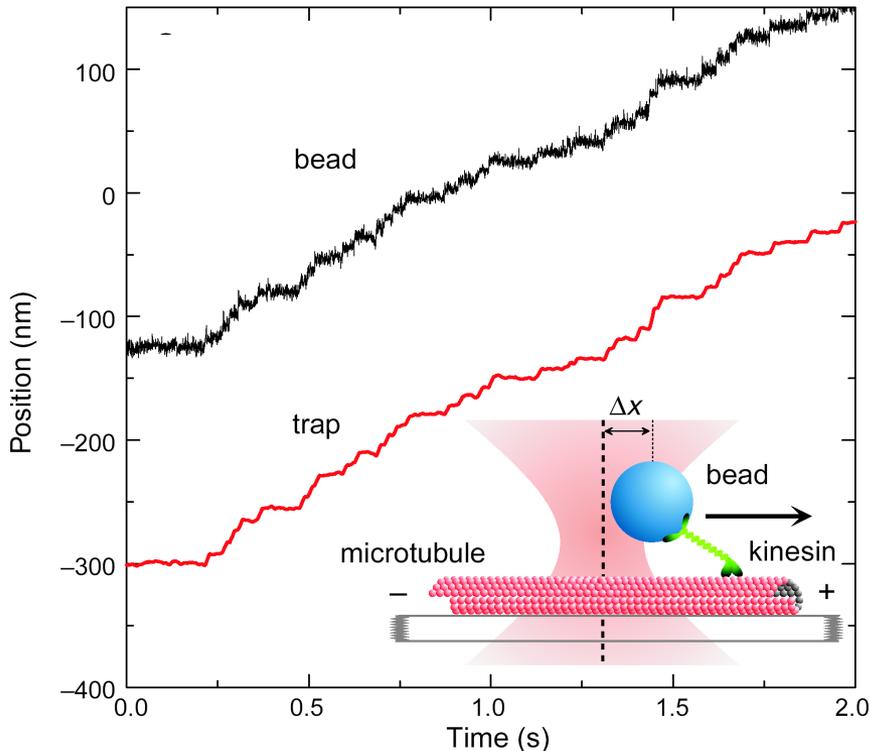
Lien tendu \rightarrow position précise

nanotechnologie



Molécule unique

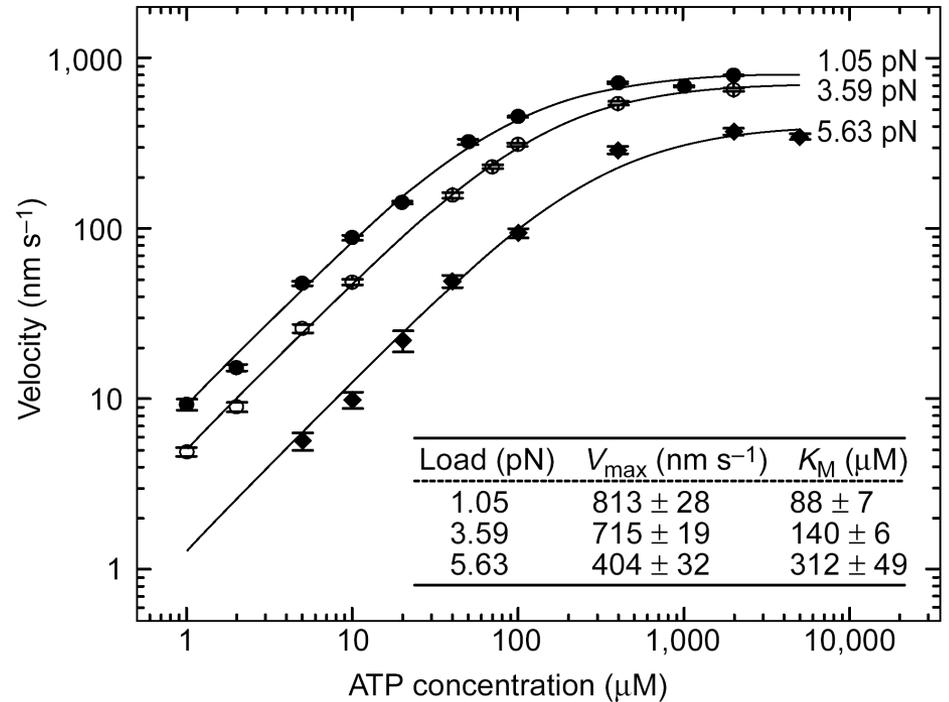
Aventures statistiques
à l'échelle d'une molécule



Feed-back pour maintenir force

Infos sur dynamique intime

En moyenne: enzymologie classique
mais sous force contrôlée



Cinétique de Michaelis-Menten

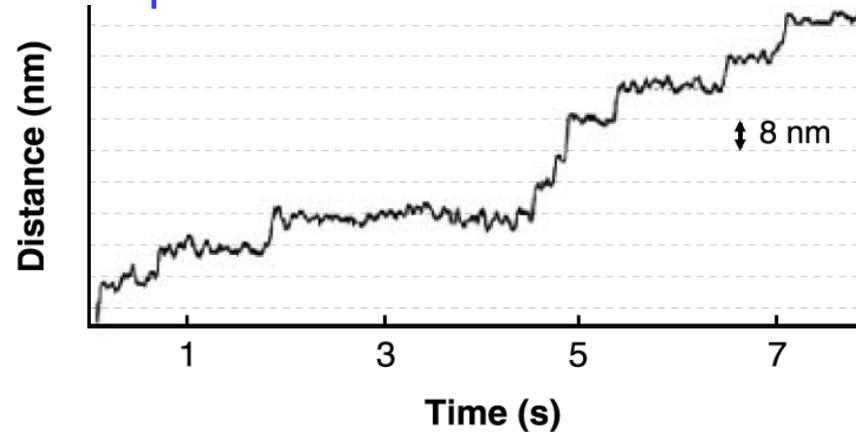
$$v = v_{max} \frac{[ATP]}{K_m + [ATP]}$$

(explications au tableau + poly)

Résultats

Mouvement bruité par nano-pas:

->le moteur sent la périodicité du filament



Mouvement vers extrémité +,
vitesses moyennes \sim nm/s to μ m/s

en l'absence de gradients !

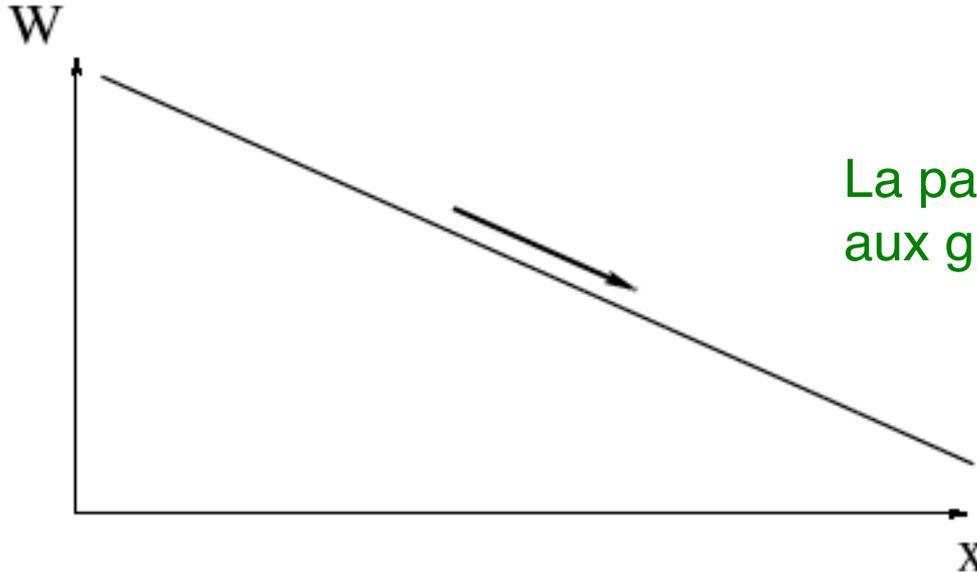
Peut se déplacer contre des forces de quelques pN,
Peut conséquemment tirer des charges

Nécessite ATP dans la solution

3- Des Moteurs chez Brown? regard naïf de physicien

Mouvement de particules Browniennes

Pour un mouvement dirigé: appliquer une force



$$F = - \partial_x W$$

La particule est plus « heureuse »
aux grandes valeurs de x

Mouvement d'une particule dans un potentiel $W(x)$

$$\partial_t P + \partial_x J = 0$$

$$J = P \left(\underbrace{-\partial_x W / \gamma}_{V_{\text{moy}}} - D \partial_x P \right)$$

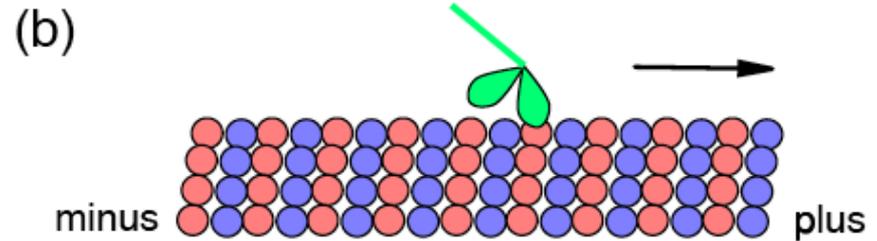
V_{moy}

$$\gamma D = k_B T$$

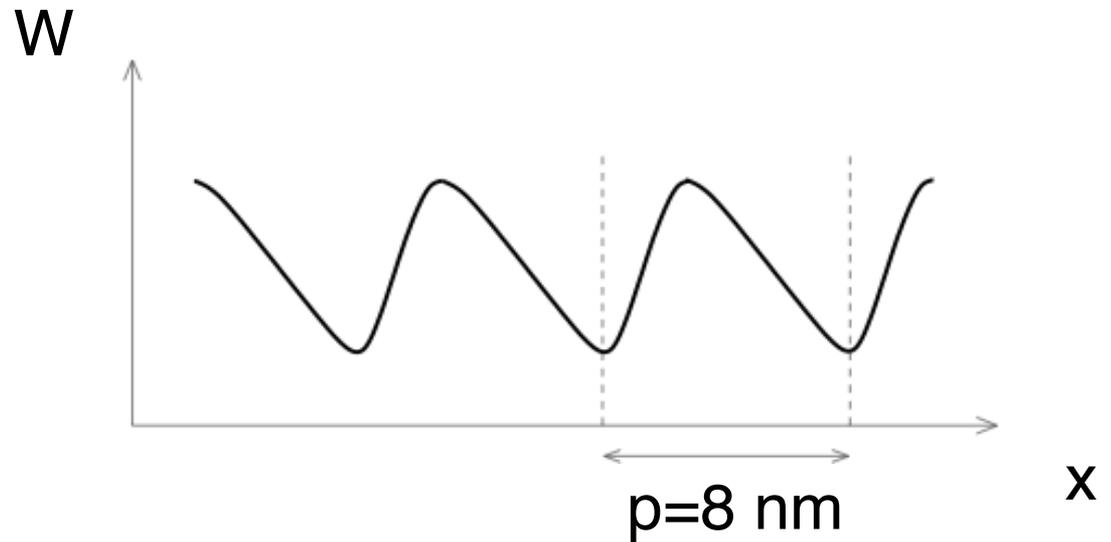
Einstein

Kinésine: pourquoi le mouvement ?

Environnement périodique
et asymétrique (polaire)



Correspond à

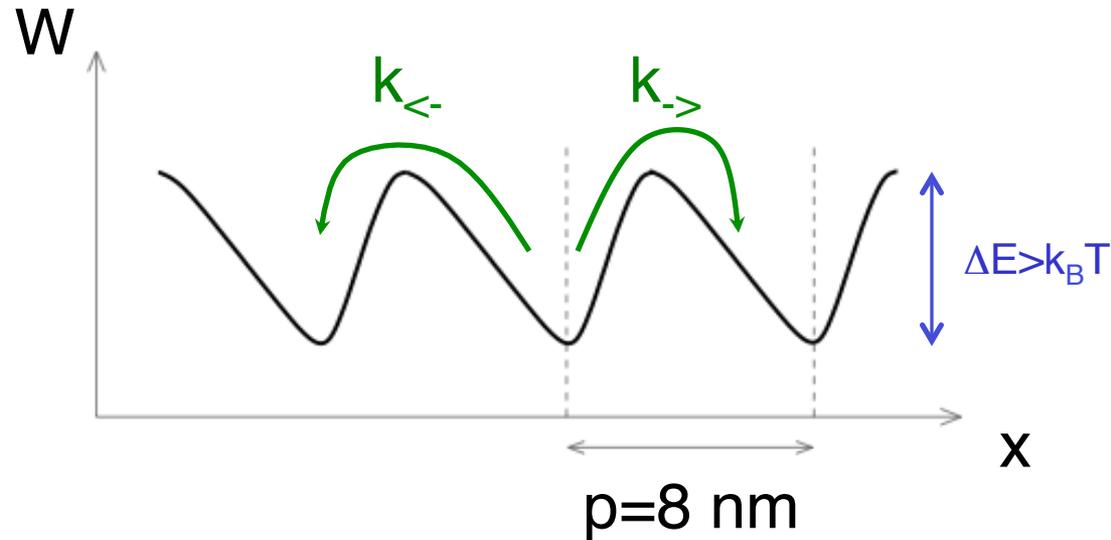


La kinésine ne préfère pas être au bout « plus » !

Mouvement vient de l'agitation thermique ?

Environnement périodique
et asymétrique (polaire)

+ $k_B T$



Deuxième principe de la thermodynamique:
pas de moteur monotherme !

$$k_{\rightarrow} = k_{\leftarrow}$$

se retrouve à partir du bilan détaillé:
pas de courant pour la distribution de Boltzmann

Mouvement vient d' une force extérieure ?

$$W = W(f=0) - f x$$

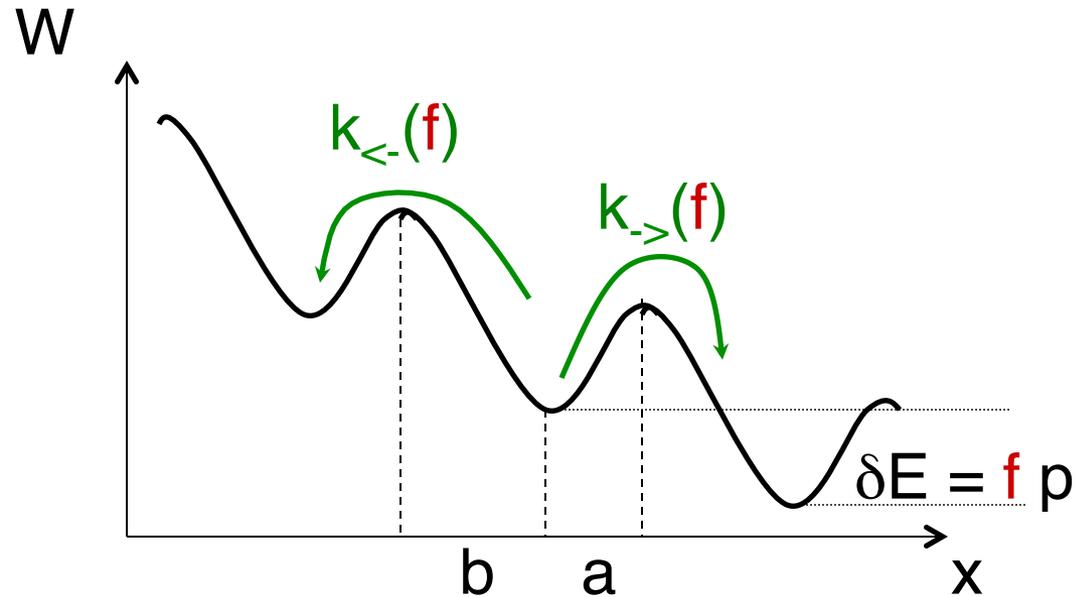
thermodynamique

$$k_{\rightarrow} / k_{\leftarrow} = \exp(\delta E / k_B T)$$

cinétique activée (f faible)

$$k_{\rightarrow}(f) = k_{\rightarrow}(0) \exp(+ f a / k_B T)$$

$$k_{\leftarrow}(f) = k_{\leftarrow}(0) \exp(- f b / k_B T)$$



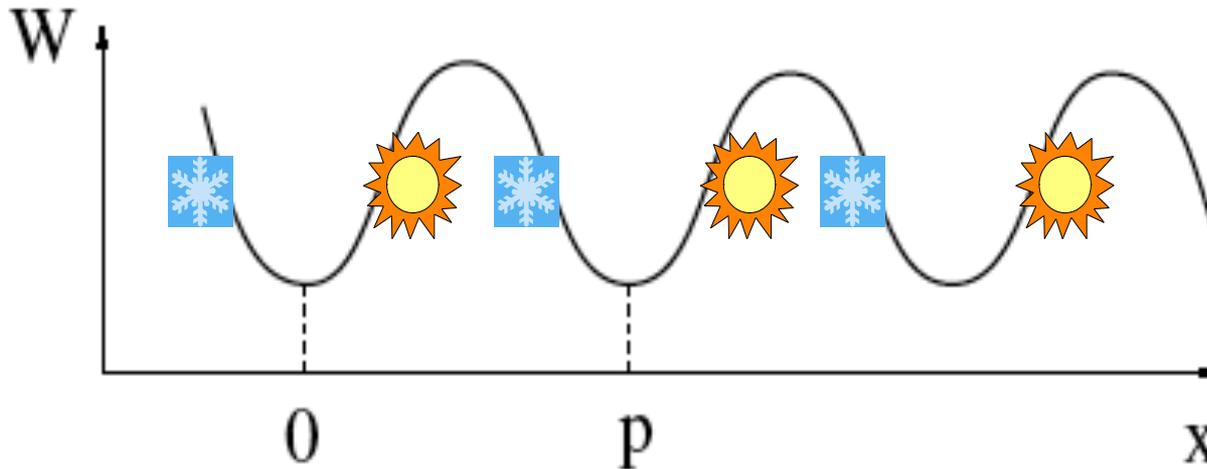
$$\text{Vitesse moyenne: } V = p [k_{\rightarrow}(f) - k_{\leftarrow}(f)]$$

Malheureusement:

expériences in vitro: pas de gradients globaux, pas de force

Nano-moteurs de Carnot ?

En principe



Non-isotherme
symétrie brisée

$$J = P (-\partial_x W / \gamma) - D(x) \partial_x P$$



Courant
effectivement

Malheureusement : diffusivité thermique

la chaleur (par exemple fournie par l'hydrolyse de l'ATP)
est dissipée en 10^{-7} s à l'échelle de 10 nm

-> pas de gradient de T stable à l'échelle d'opération du moteur

4- Moteurs chimiques isothermes

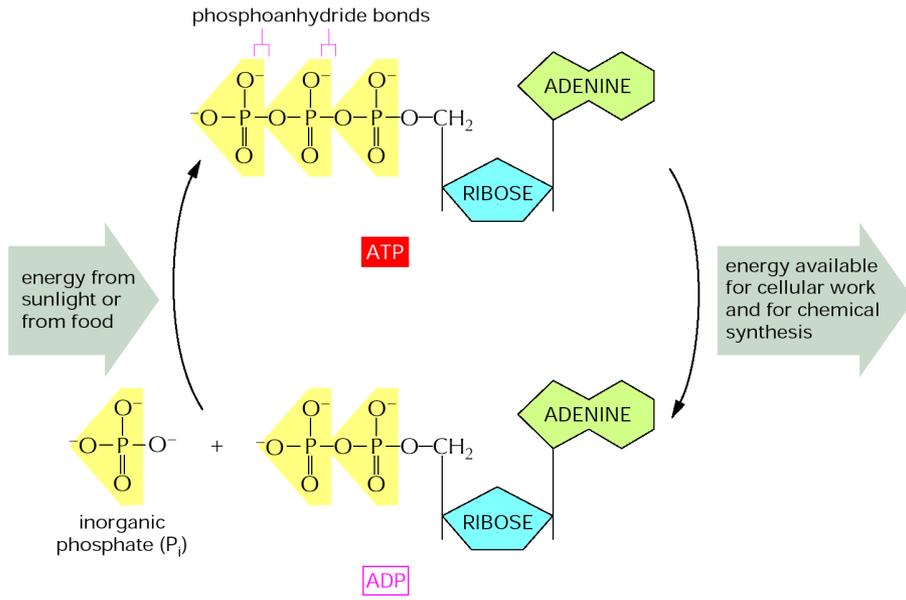
4a- source d' énergie

4b- régime linéaire

4c- image biochimique: couplage fort

4d- couplage faible

Moteur chimique: ATP carburant



hydrolyse de l'ATP peut se faire sur la tête du moteur en interaction avec le filament

--> couplage chimie mécanique

Formellement: moteur chimique isotherme

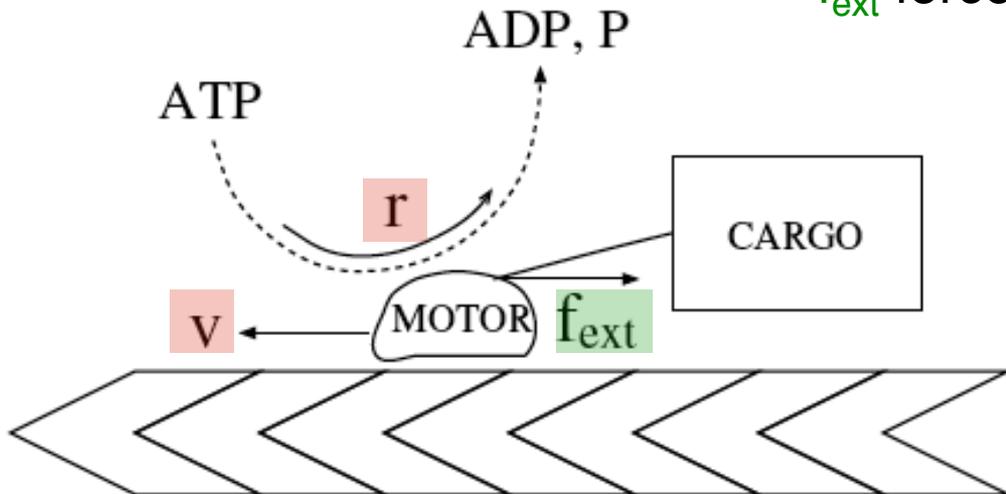
description moyennée
dans le temps

v vitesse du moteur

r taux d'hydrolyse de l'ATP (en s^{-1})

$\Delta\mu = \mu_{ATP} - \mu_{ADP} - \mu_P$ mesure l'excès d'ATP

f_{ext} force mécanique

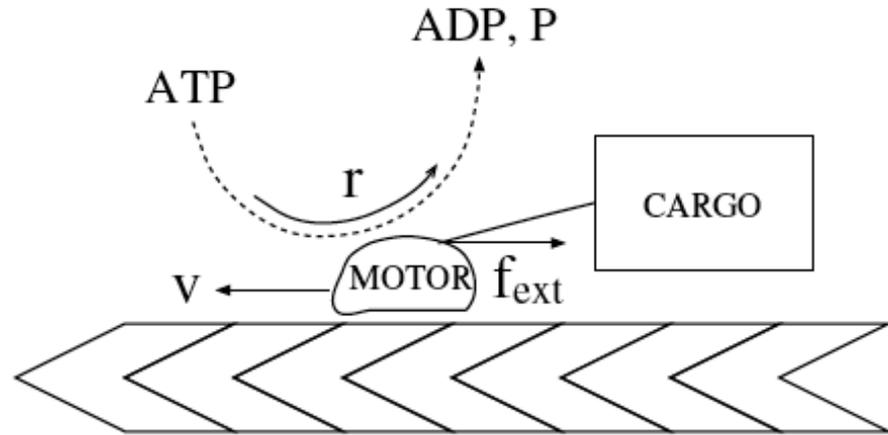


$\Delta\mu$ « force chimique »

Thermo hors équilibre
forces \rightarrow flux

A l'équilibre: $\Delta\mu=0$ $f_{ext}=0$ $\rightarrow v=0$ $r=0$

4b- Réponse linéaire



v vitesse du moteur

r taux d'hydrolyse de l'ATP (en s^{-1})

$\Delta\mu = \mu_{ATP} - \mu_{ADP} - \mu_P$ mesure l'excès d'ATP

f_{ext} force mécanique extérieure

A l'équilibre: $\Delta\mu=0$ $f_{ext}=0$
 $\rightarrow v=0$ $r=0$

Près de l'équilibre

- Linear response:

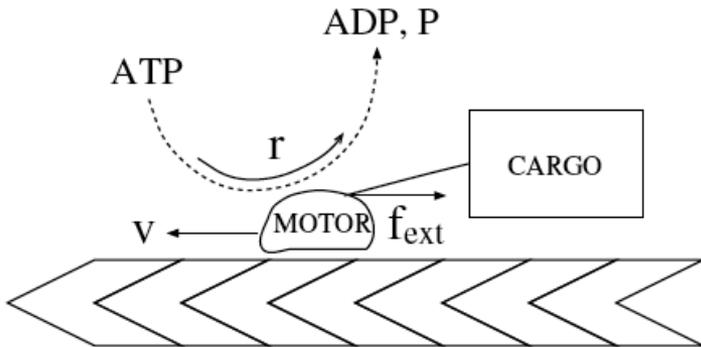
$$\begin{cases} \vec{v} = \lambda_{11}\vec{f}_{ext} + \lambda_{12}\Delta\hat{\mu} \\ r = \lambda_{21}\vec{f}_{ext} + \lambda_{22}\Delta\hat{\mu} \end{cases}$$

- Dissipation: $\Pi = \vec{f}_{ext}\vec{v} + r\Delta\hat{\mu} > 0$

Coefficients de couplage
= vecteurs !

Polarité des filaments
nécessaire !

Potentiellement: moteur ou usine

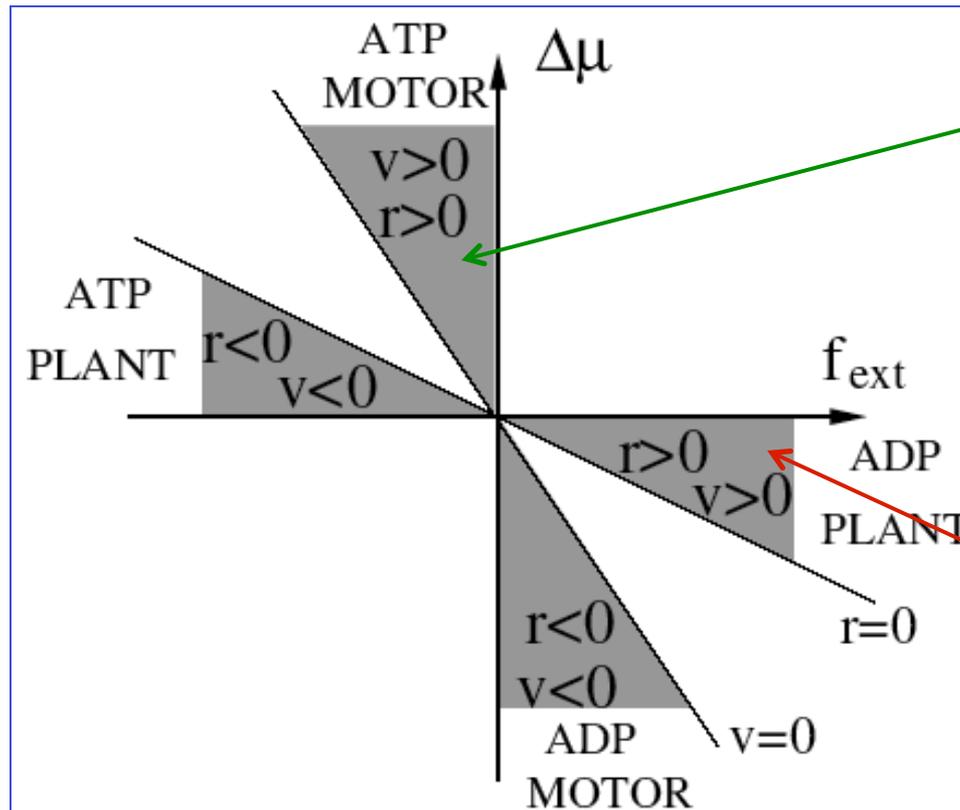


v vitesse du moteur

r taux d'hydrolyse de l'ATP (en s^{-1})

$\Delta\mu = \mu_{ATP} - \mu_{ADP} - \mu_P$ mesure l'excès d'ATP

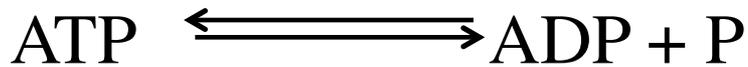
f_{ext} force mécanique extérieure



MOTEUR A ATP
ATP en excès
fournit mouvement
contre la force

USINE A ADP
Force positive
produit ADP
pourtant en excès

Conditions physiologiques



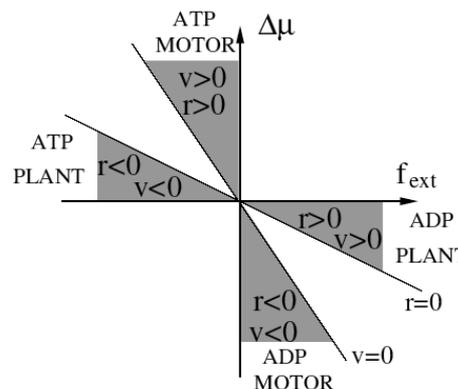
$[\text{ATP}] \sim 10\text{mM}$; $[\text{ADP}] \sim 1\mu\text{M}$; $[\text{P}] \sim 1\text{mM}$ $\rightarrow \Delta\mu$ d'ordre $25 k_B T$

Forces $<$ quelques pN

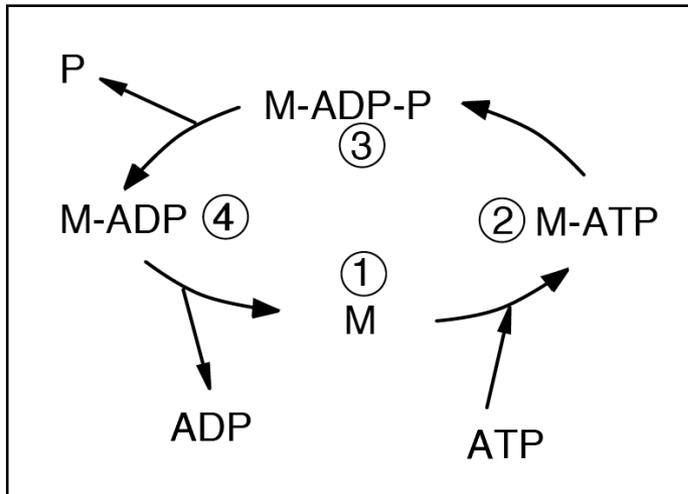
$\rightarrow f_{\text{ext}}$ d'ordre qqs $k_B T$

(très) loin
de l'équilibre

X



4c- Cycle mécano-chimique: ex. actine



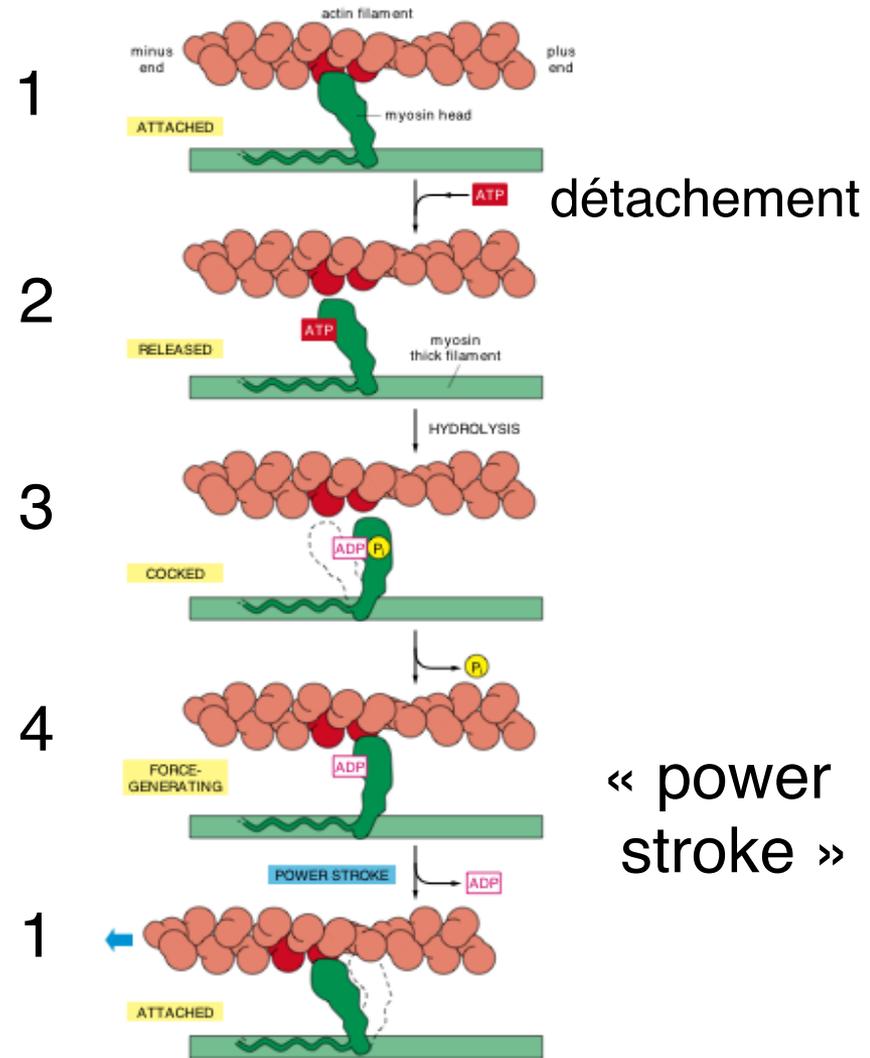
Beaucoup d' «états »

Expérimentalement pas très bien définis

Couplage méca-chimie fort !

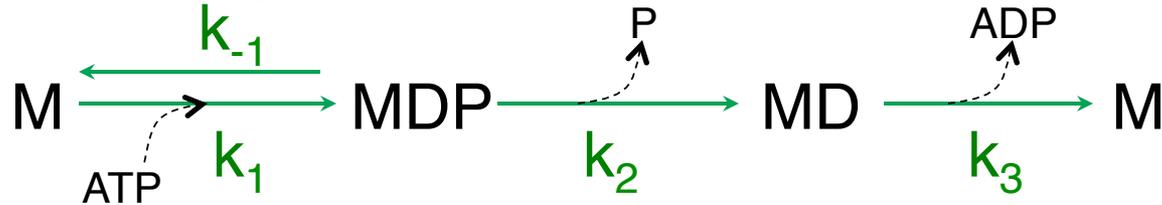
1 hydrolyse et 1 pas par cycle

Des transitions couplant chimie et mécanique



4c- Cycle mécano-chimique: modèle

Schéma le plus simpliste



Intermédiaires à l'éq.

Taux d'hydrolyse par u.d.t. = $k_{tot} \cdot [M]$

d'où le taux d'hydrolyse par moteur

$$k_{tot} = k_{cat} \frac{[ATP]}{K_m + [ATP]}$$

Michaelis-Menten

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

Vitesse directement liée à ces constantes :

$$V = p k_{tot}$$

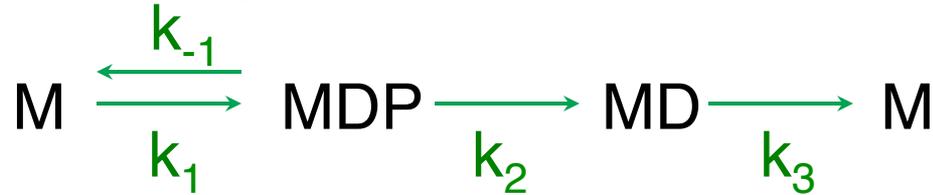
pas

En pratique, vitesse max limitée par k_2 (et k_3)

OdG: $k_2 \sim 100 \text{ s}^{-1}$; $k_3 \sim 5000 \text{ s}^{-1}$ --> $V_{max} \sim \mu\text{m/s}$

4c- Effet d'une force ?

Schéma le plus simpliste



$$V = p k_{\text{tot}}$$

$$k_{\text{tot}} = k_{\text{cat}} \frac{[ATP]}{K_m + [ATP]}$$

Michaelis-Menten

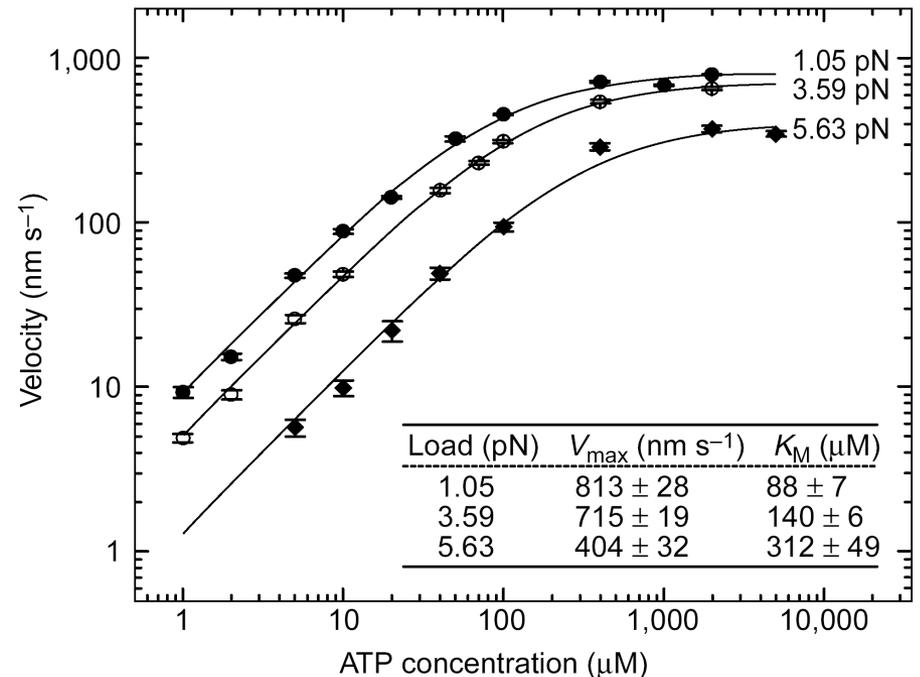
Remplacer:

$$k_i(f) = k_i(0) \exp\left(-\frac{f \cdot \delta_i}{k_B T}\right)$$

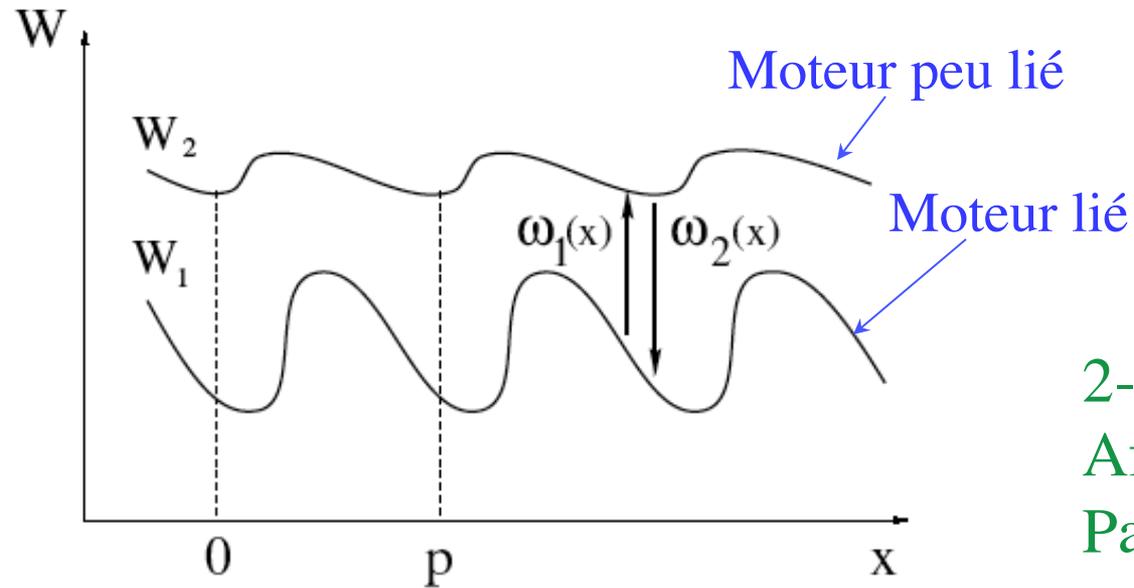
Mais que sont les δ_i ?

Répartition entre k_1 et k_{-1} ?

-> Aller-retour avec exp.

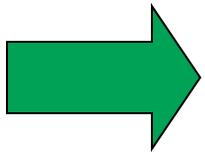


4d- couplage faible

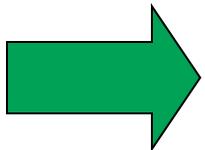


1- potentiels asymétriques
déplacements décrits par
équation de diffusion

2- Transitions chimiques pures
Affectées par excès d' ATP
Pas de déplacement
-> peu sensibles à f_{ext}



Mouvement même sans force extérieure
Moteur chimique isotherme



Efficacité dépend de relations temps/structures

5- Perspectives

5a- d' autres moteurs

5b- détail de chaque moteur

5c- comportement collectifs

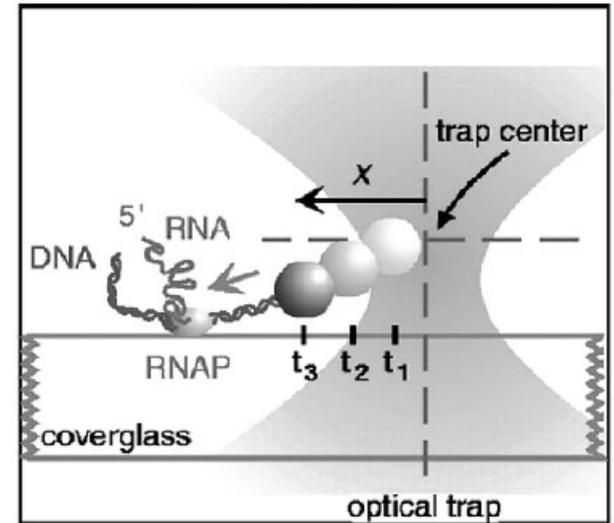
5d- moteurs et filaments

5a- d' autres nanomoteurs/usines

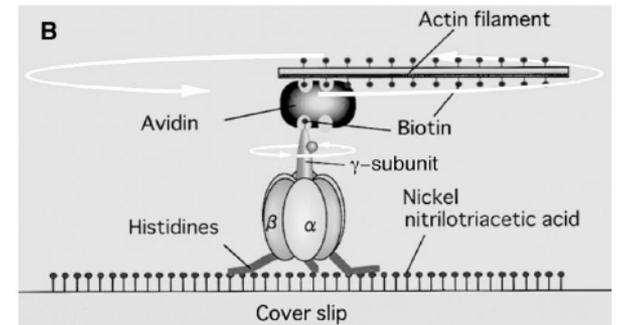
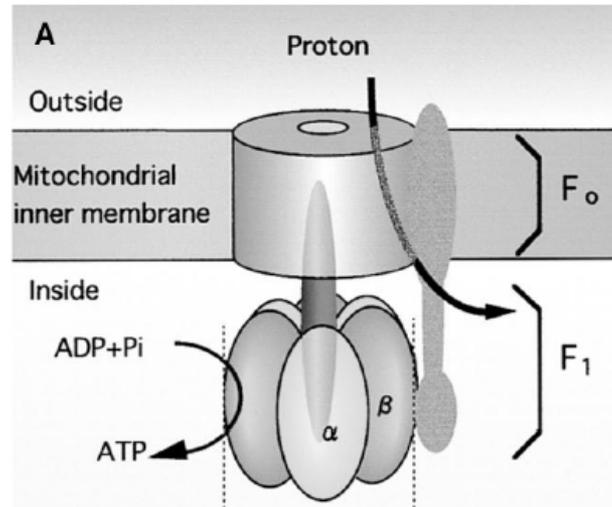
linéaires

rotatifs

RNA-polymerase



F_0 - F_1 ATPase



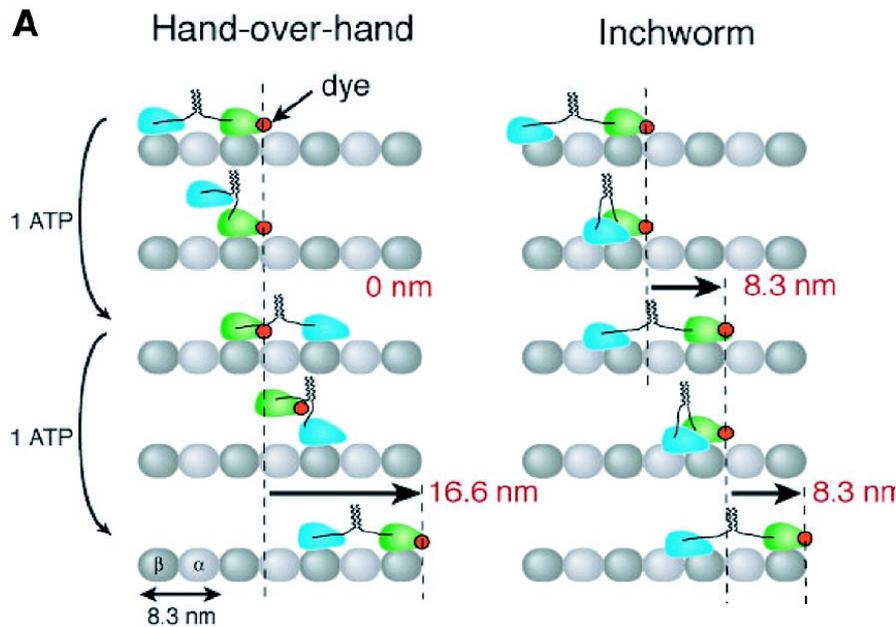
Moteur des flagelles hélicoidaux

5b- détail de chaque moteur

Pb: plusieurs modèles prédisent schématiquement le type de courbes $v([ATP],f)$ observées

- détection conjointe d'hydrolyse (par fluo) et mécanique.
- Mécanismes de mouvement pour plusieurs têtes.

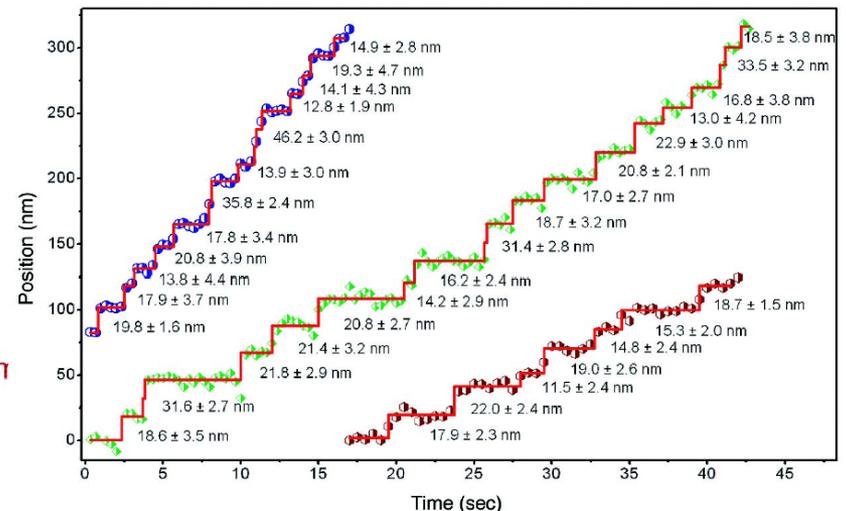
Mutation pour marquage fluo



Kinesin Walks Hand-Over-Hand

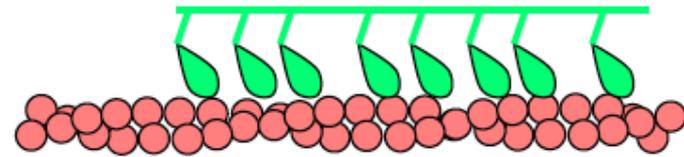
Ahmet Yildiz,¹ Michio Tomishige,^{3*} Ronald D. Vale,³
Paul R. Selvin^{1,2†}

30 JANUARY 2004 VOL 303 SCIENCE

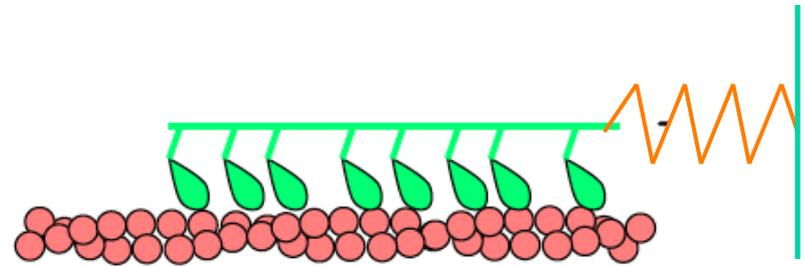
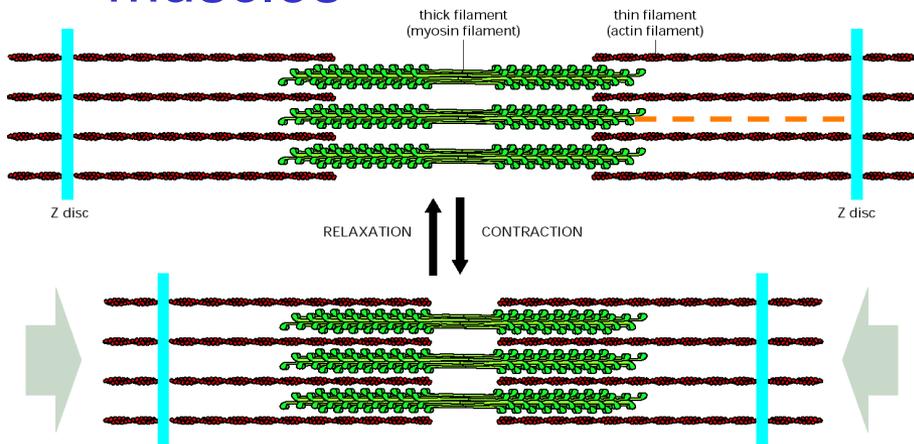


5c- comportements collectifs

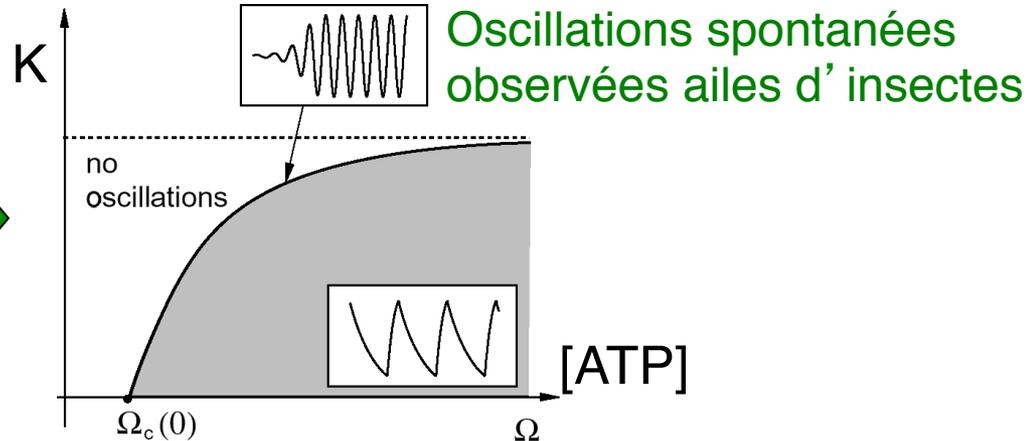
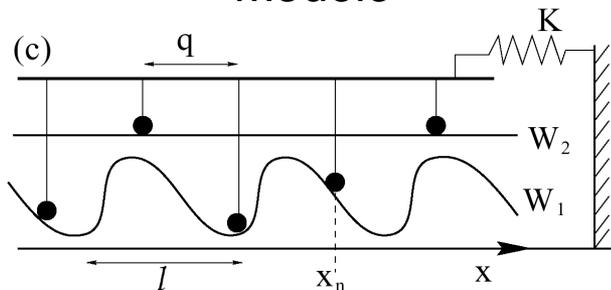
friction effective



muscles



modèle



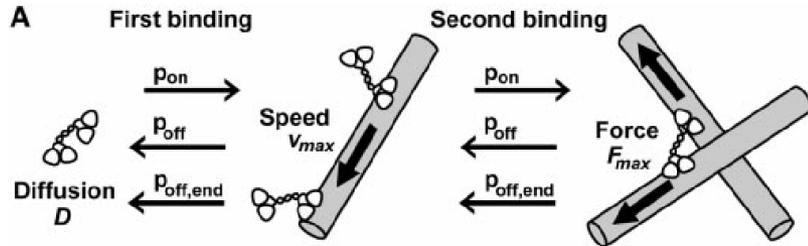
Oscillations spontanées observées ailes d'insectes

[ATP]

5d- Moteurs et filaments

Organisation dans espace et temps

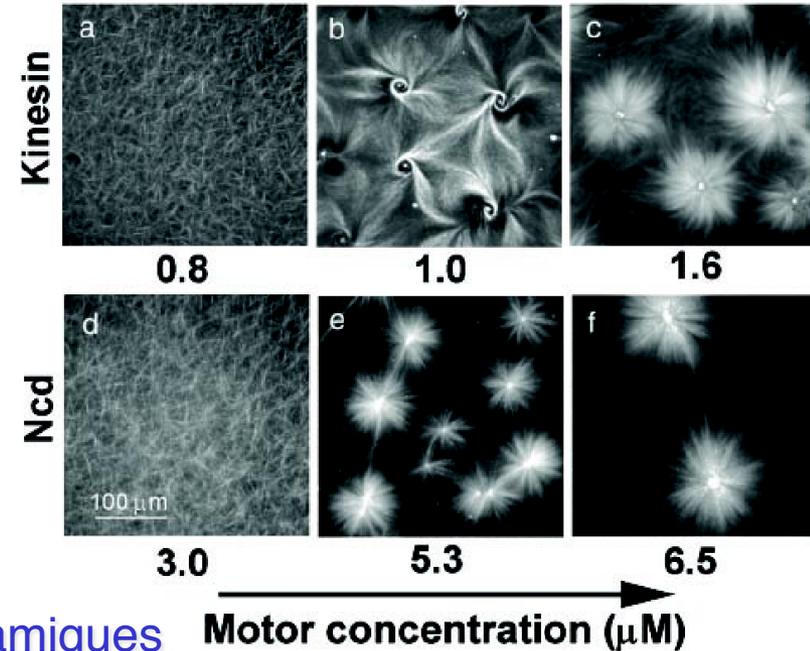
In vitro: soupe de protéines, d'ATP et GTP:



Filaments croissent/décroissent et guident moteurs
Moteurs se déplacent et poussent sur filaments
diffusent quand libres

modélisable par simulations

Structures dynamiques



Motor concentration (μM)

