# Physique des systèmes biologiques :

# des molécules aux réseaux

Armand Ajdari Ulrich Bockelmann Remi Monasson

# Table des matières

1	La	cellule : constituants, activités et principes physiques	<b>5</b>
	1.1	Introduction	5
	1.2	Description de la cellule vivante	5
	1.3	Constituants moléculaires	6
	1.4	Energie et entropie, la cellule ne viole pas la seconde loi de la thermodynamique	8
	1.5	Catalyse enzymatique : la loi de Michaelis-Menten.	9
	1.6	Quelques processus enzymatiques	11
		1.6.1 Moteurs moléculaires et filaments	11
		1.6.2 Processus élémentaires du vivant	11
	1.7	Conclusions du chapitre	12
<b>2</b>	Hyo	drodynamique pour la cellule	13
	2.1	Viscosité et nombre de Reynolds	13
		2.1.1 Viscosité	13
		2.1.2 Nombre de Reynolds	14
		2.1.3 Ordres de grandeur	15
		2.1.4 Force critique	16
	2.2	Friction dans le monde des petits nombres de Reynolds	16
		2.2.1 Formellement : relation force-vitesse	16
		2.2.2 Pratiquement : formule de Stokes	17
		2.2.3 Ordres de grandeur dans le monde cellulaire	17
	2.3	Quelques remarques complémentaires	17
	2.4	Conclusions du chapitre	18
3	Cyt	coplasme et entropie	19
	3.1	Introduction : la cellule est une soupe dynamique	19
	3.2	Petites molécules, ions	10
			19
		3.2.1 Solubilité	19 19
		3.2.1       Solubilité	19 19 21
		3.2.1       Solubilité	19 19 21 22
		3.2.1       Solubilité	19 19 21 22 22
	3.3	3.2.1       Solubilité	<ol> <li>19</li> <li>19</li> <li>21</li> <li>22</li> <li>22</li> <li>23</li> </ol>
	3.3	3.2.1       Solubilité	19 19 21 22 22 23 23
	3.3	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets	19 19 21 22 22 23 23 23 24
	3.3	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets	19 19 21 22 22 23 23 23 24 25
	3.3 3.4	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets	19 19 21 22 23 23 23 24 25 26
4	3.3 3.4 Diff	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets	<ol> <li>19</li> <li>19</li> <li>21</li> <li>22</li> <li>23</li> <li>23</li> <li>24</li> <li>25</li> <li>26</li> <li>28</li> </ol>
4	3.3 3.4 <b>Diff</b> 4.1	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets       De plus gros objets         3.3.1       Le problème : attraction "universelle" à longue portée         3.3.2       Interactions électrostatiques : écrantage         3.3.3       Raffinements entropiques         Conclusions du chapitre       Conclusions du chapitre	<ol> <li>19</li> <li>19</li> <li>21</li> <li>22</li> <li>23</li> <li>23</li> <li>24</li> <li>25</li> <li>26</li> <li>28</li> <li>28</li> </ol>
4	3.3 3.4 <b>Diff</b> 4.1 4.2	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets       De plus gros objets         3.3.1       Le problème : attraction "universelle" à longue portée         3.3.2       Interactions électrostatiques : écrantage         3.3.3       Raffinements entropiques         Conclusions du chapitre       Conclusions du chapitre         Idée physique       Modèle idéalisé	<ol> <li>19</li> <li>19</li> <li>21</li> <li>22</li> <li>23</li> <li>23</li> <li>24</li> <li>25</li> <li>26</li> <li>28</li> <li>28</li> <li>28</li> </ol>
4	3.3 3.4 Diff 4.1 4.2	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets	<ol> <li>19</li> <li>19</li> <li>19</li> <li>21</li> <li>22</li> <li>22</li> <li>23</li> <li>23</li> <li>24</li> <li>25</li> <li>26</li> <li>28</li> <li>28</li> <li>28</li> <li>28</li> <li>29</li> </ol>
4	3.3 3.4 <b>Diff</b> 4.1 4.2	3.2.1       Solubilité         3.2.2       Cas des Ions         3.2.3       Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe         3.2.4       Pression osmotique         De plus gros objets	<ol> <li>19</li> <li>19</li> <li>19</li> <li>21</li> <li>22</li> <li>23</li> <li>23</li> <li>24</li> <li>25</li> <li>26</li> <li>28</li> <li>28</li> <li>28</li> <li>29</li> <li>30</li> </ol>

		4.2.4 Description de Langevin	1
	4.3	Description macroscopique	<b>2</b>
	4.4	Sortie d'un piège	3
		4.4.1 Formule de Kramers	3
		4.4.2 Argument qualitatif	5
	4.5	Conclusions du chapitre	5
<b>5</b>	Hyl	bridation de l'ADN et de l'ARN 30	6
	5.1	Introduction	6
	5.2	Approches expérimentales 30	6
	5.3	Description théorique de l'équilibre entre deux états 3'	7
	5.4	Un modèle pour prédire $\Delta H$ et $\Delta S$ à partir de la séquence $\ldots \ldots \ldots$	0
	5.5	Conclusions du chapitre	1
6	Puc	ces à ADN 42	2
	6.1	Déscription de la technologie des puces à ADN 42	2
		6.1.1 Sondes	2
		6.1.2 Cibles	3
		6.1.3 Hybridation	3
		6.1.4 Détection	4
		6.1.5 Analyse des signaux de fluorescence	4
	6.2	Influence de la surface sur l'hybridation	4
	6.3	Détection électronique de biomolécules	$\overline{5}$
		6.3.1 Motivations et principe de la détection électronique	5
		6.3.2 Structures de transistor et mesure électrique	6
		633 Détection de l'ADN	6
		634 Autres methodes	8
	64	Conclusions du chapitra	o a
	0.4		9
7	Ela	sticité de polymères et dépliement mécanique 50	D
	7.1	Elasticité de polymères	0
		7.1.1 Chaîne idéale à force nulle	Ô
		7.1.2 Chaînes idéales soumises à une force de traction	1
		71.3 Chaîne avec corrélations	2
	72	Dépliement mécanique	$\frac{1}{2}$
	•••	$7.21$ Ouverture de l' $\Delta DN$ 5'	อ
		7.2.2. Transitions spontanées entre états ouvert et fermé dans une épingle à chaveux d'ARN 50	6
	73	Conclusions du chapitre	8
	1.0		5
8	Fila	aments du cytosquelette 59	9
	8.1	Cytosquelette : une armature dynamique	9
	8.2	Propriétés génériques des filaments du cytosquelette	9
	0	8.2.1 Assemblage	9
		8.2.2 Rigidité mécanique : constante de courbure et longueur de persistance	Õ
	8.3	Filaments · les trois grandes familles	1
	0.0	831 Actine	1
		832 Microtubulos	1
		833 Filomonts intermédiaires	т Э
		8.3.4 Un commontaire : outo accomblage at approche bettom un	2 0
	Q /	Détermination avnérimentale de la vigidité des flaments	പറ
	୦.4 ୦୮	Accomblage dynamicus des filaments : nolymétrication et dépolymétrication	2 9
	0.0	Assemblage dynamique des maments : porymensation et deporymensation 0	ე ⊿
		0.0.1 AUIIIT	± ۲
		0.0.2 MICTOUDDUES	Э г
	0.0	<b>8.3.5</b> Generation de force et de mouvement	Э —
	8.6	Conclusions du chapitre $\ldots \ldots \ldots$	1

9	Mo	teurs moléculaires - protéines motrices	68
	9.1	Introduction : protagonistes et fonctions	68
	9.2	Détermination physique des propriétés des moteurs	69
		9.2.1 Tests de motilité et de bille	69
		9.2.2 Résultats typiques d'une expérience particulière : kinésine sur bille	70
		9.2.3 Processivité	70
	9.3	Fonctionnement des moteurs : quelques éléments génériques	71
	9.4	Modèles	71
		9.4.1 Près de l'équilibre thermodynamique : une description générique	71
		9.4.2 Une image classique : cinétique chimique pour changements d'états discrets	74
		9.4.3 Modèles hybrides à deux ou plusieurs états	74
		9.4.4 Lien avec l'expérience	76
	9.5	Au delà : directions de recherche	76
-			
10	) $\mathbf{Res}$	eaux de régulation	77
	10.1		77
	10.2		77
		10.2.1 Mecanisme	77
		10.2.2 Technique de mesure	79
	10.0	10.2.3 Observations	79
	10.3	Modelisation d'un reseau de rgulation	79
	10.4	Interaction entre proteine et ADN	81
	10.5	Comment le represseur trouve le site operateur sur l'ADN	81
		10.5.1 Recherche par diffusion $3D$ : la limite de Debye-Smoluchowsky	82
		10.5.2 Recherche par diffusion ID	82
	10.0	10.5.3 Recherche par diffusion mixte ID et 3D : BWH	82
	10.6	Conclusions du chapitre	83
11	Des	neurones aux synapses : physiologie et principes de fonctionnement	85
	11.1	Physiologie	85
	11.2	Le neurone : enregistrement, fonctionnement et modélisation	86
		11.2.1 La technique du patch-clamp	86
		11.2.2 Canaux ioniques	86
		11.2.3 Potentiels d'action : émission et propagation	88
		11.2.4 Techniques de mesure de l'activité neuronale	90
	11.3	Les interactions : description et plasticité	91
		11.3.1 Description des synapses	91
		11.3.2 Mécanismes d'apprentissage : potentiation et dépressions synaptiques	93
	11.4	Conclusions du chapitre	95
	11.5	Petite Classe : Le neurone intègre-et-décharge	97
		0 0	

### Introduction

Ce polycopié accompagne le cours intitulé "Physique des objets biologiques : du nanomètre au micron", enseigné à l'Ecole Polytechnique. L'apport de la physique à la biologie est instrumental et conceptuel. La physique contribue de façon non négligeable aux développements de la biologie et les objets et processus biologiques motivent et inspirent un nombre croissant de physicien dans leur démarche scientifique. Nous avons essayé d'illustrer ces différents aspects dans le cours. Comme une partie significative de ce domaine scientifique est relativement jeune et évolue vite, nous présentons aussi quelques recherches expérimentales et théoriques très récentes. Dans ce cas, quelques résultats et interprétations peuvent naturellement être préliminaires.

Le chapitre 1 introduit un certain nombres de notions de base. Il contient une présentation de la cellule biologique avec ses constituants moléculaires et ses processus élémentaires et un premier aperçu des concepts physiques correspondants. Dans le chapitre 2 suit une description de l'hydrodynamique en régime visqueux, utile pour décrire les mouvements de petits objets en milieu aqueux. A l'échelle de la cellule l'inertie devient négligeable par rapport à la friction visqueuse. Il s'agit d'un régime très différent de notre expérience habituelle de natation dans une piscine. Les particules s'y comportent plutôt comme des grains dans un pot de miel. L'écoulement est laminaire, non turbulent. Le chapitre 3 traite des particularités des interactions en milieu aqueux et quelques éléments de la physique des colloides : la solubilité, l'osmose, la floculation, etc. Le chapitre 4 contient une description du mouvement brownien et de la diffusion comme marche aléatoire. Nous allons présenter le lien qui existe entre la diffusion et la friction, la rélation d'Einstein, variante du théorème de fluctuation dissipation de la physique statistique. Les chapitres 5 et 6 sont consacrés à l'ADN. Dans ces chapitres nous traiterons la physique statistique de la reconnaissance spécifique entre deux brins et décrirons les puces à ADN et les biocapteurs à base de transistors à effet de champ. Dans le chapitre 7 nous étudions l'élasticité des biopolymères et les techniques récentes de micromanipulation et de mesure de force sur molécule unique. Dans le chapitre 8, intitulé filaments du cytosquelette, nous analysons les propriétés génériques des filaments d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires et présentons des situations où le caractère dynamique et hors équilibre de l'assemblage des filaments est manifeste. Cette physique est fondamentale pour comprendre le mouvement d'une cellule sur un substrat solide et la mécanique de la division cellulaire. Les moteurs moléculaires sont le sujet du chapitre 9. Nous nous focaliserons sur les moteurs dites "linéaires" qui se déplacent sur un filament et décrirons les différentes principes physiques du mouvement. Le chapitre 10 est consacré aux réseaux de régulation. Nous considérons quelques mécanismes physiques et la modélisation des réseaux de régulations à l'exemple de l'opéron lactose chez la bactérie E.coli.

### Chapitre 1

# La cellule : constituants, activités et principes physiques

### **1.1** Introduction

Pourquoi du point de vue de la physique s'intéresser à la cellule biologique ? Les trois thèses suivantes provenant de la théorie de la cellule illustrent son importance :

- (1) Toute organisme vivant est composé d'une ou de plusieurs cellules.
- (2) La cellule est l'unité structurale de la vie.
- (3) Une cellule peut naître uniquement d'une division d'une cellule préexistante.

Si on est intéressé par une description plus que qualitative des phénomènes du vivant, il est souvent sage de commencer avec l'étude d'un processus biologique à l'échelle de la cellule individuelle ou même de se limiter à un processus qui fait intervenir seulement une petite partie de la cellule. La taille typique d'une cellule est de l'ordre de un à quelques dizaines de micromètres et celle de ses constituants moléculaires est le nanomètre. C'est pourquoi nous avons intitulé ce cours "Physique des objets biologiques : du nanomètre au micron". A cette échelle cellulaire et moléculaire existent des exemples particulièrement clairs des concepts physiques. Les applications biotechnologiques les plus importantes correspondent également à cette échelle de longueur.

### **1.2** Description de la cellule vivante

Commençons par quelques observations importantes sur la cellule vivante. (i) La cellule est complexe et est organisée en plusieurs compartiments séparés. (ii) La cellule a un programme génétique et la capacité de l'utiliser. Ce programme est encodé dans la séquence de bases des molécules d'ADN. (iii) La cellule est capable à se reproduire. (iv) La cellule importe et consomme de l'énergie. Dans les mitochondries de la cellule animale par exemple des sucres (glucose) sont convertis en molécules d'ATP. L'ATP est la source d'énergie pour la majorité des réactions dans la cellule. (v) Un grand nombre de réactions chimiques a lieu dans la cellule : par exemple la synthèse des protéines par des ribosomes sur le réticulum endoplasmique. (vi) La cellule est engagée dans une multitude d'activités mécaniques, telles que la croissance, la division, le transport interne de molécules et le mouvement de la cellule. (vii) La cellule réagit à des stimulations externes. Par exemple un signal externe peut induire la division, le mouvement ou même le suicide d'une bactérie. Elle peut se développer différemment suivant son environment .

Dans un environnement naturel la cellule est constituée principalement d'eau (70% en poids). L'hydrodynamique est souvent utilisée pour la description du milieu intra cellulaire. La gamme de température des organismes vivants correspond à celle de l'eau liquide.

### **1.3** Constituants moléculaires

Le "dogme central" de la biologie moléculaire dit que l'information stockée dans l'ADN est transmise à l'ARN et ensuite utilisée pour la synthèse des protéines (Figure 1.1). Les processus élémentaires correspondants s'appellent respectivement, transcription, traduction et réplication.



**Figure 1.1.** Le flux de l'information dans la cellule biologique : de la séquence de base de l'ADN à la synthèse des protéines.

On connaît au moins deux exceptions à ce dogme. La rétrotranscription (ARN $\rightarrow$ ADN, utilisée par exemple par les virus HIV) et l'induction conformationelle d'une protéine (protéine $\rightarrow$ protéine, impliquée dans les maladies à prions).

Les phospholipides sont également très importants. Ils forment les membranes : la membrane plasmique qui sépare la cellule de l'extérieur et les membranes cytoplasmiques. Soulignons que le système est dynamique : il y a constamment synthèse et dégradation des biomolécules.

### ADN et ARN

Les acides nucléiques ADN et ARN sont des polymères linéaires. Les monomères (nucléotides) sont constitués d'un groupement phosphate, d'un sucre et d'une base. Le sucre est un deoxy-ribose pour l'ADN et un ribose pour l'ARN. Dans les deux cas il y a 4 bases différentes, deux purines et deux pyrimidines. L'ADN contient les base purines A et G et les bases pyrimidines C et T, la base U remplace T dans l'ARN. Toutes ces bases sont planaires, les purines ont deux anneaux et sont plus grands que les pyrimidines avec un seul anneau (figure 1.2). Les nucléotides polymérisent par formation de liaisons covalentes C-O-P au niveau du groupement phosphate. Cette liaison dite phosphodiester relie l'extremité 5' d'un sucre à l'extrémité 3' d'un autre. Par conséquent chaque brin d'une acide nucléique a une direction prédéfinie (par convention de 5' vers 3'). Les groupements phosphates sont négativement chargés en milieu aqueux de pH neutre, les acides nucléiques sont des poly-électrolytes fortement négatifs. Pour l'ADN et l'ARN, il existe une interaction spécifique entre paires de bases, toujours entre une base purine et une base pyrimidine, basée sur des liaisons hydrogènes. Dans l'ADN A s'apparie avec T et C avec G. La liaison entre C et G est plus forte, d'abord parce qu'il y a trois liaisons hydrogènes pour GC par rapport à deux pour une paire AT, mais également du fait des mécanismes d'empilement des bases qui jouent un rôle important.

Deux simples brins d'ADN complémentaires s'associent et forment une structure en double hélice. La découverte de cette double hélice par Watson et Crick en 1953 était basée sur des images de diffraction des rayons X. La détermination des structures des biomolécules par diffraction des rayons X est une technique physique qui a eu, et qui continue d'avoir, un impact très important sur le développement des sciences de la vie. Cette technique mesure la densité électronique 3D avec une résolution spatiale de l'ordre de 0.1 nm=1 Å. Elle nécessite d'être capable de cristalliser le matériau à étudier. La préférence des paires de Watson et Crick (AT, GC) par rapport aux autres combinaisons s'explique en bonne partie par des arguments structuraux. Les paires de Watson et Crick occupent la même surface et un empilement de ces



Figure 1.2. Les deux types de paires de bases de l'ADN.

paires planaires est possible tout en respectant la bonne orientation des groupements sucre et phosphate. La double hélice du type B, qui se forme dans un milieu physiologique, a un diamètre de 2 nm, une longueur axiale de 0.34 nm/base et une période de 10 bases. Les bases sont à l'intérieur et les deux brins sont d'orientation 5'-3' opposée.

L'information génétique est dans la séquence, un alphabet à quatre lettres écrit le long d'un brin. Le nombre total de paires de bases dépend de l'organisme et varie entre quelques 10000 et plusieurs milliards. Entièrement déplié, la longueur de l'ADN chromosomique d'une cellule se situe entre quelques microns et quelques mètres. Dans la cellule l'ADN est compacté fortement dans une hiérarchie compliquée de structures impliquant des protéines, notamment des histones. Ainsi, l'ADN humain d'une longueur totale d'un mètre, divisé en 23 chromosomes, peut tenir dans un noyau de quelques microns.

L'ARN est une molécule simple brin. Les liaisons hydrogènes donnent lieu à une structure intrabrin 3D compliquée avec des parties appariées, hélicales, des boucles et autres. Il existe aussi des interactions dites tertiaires entre ces différents motifs. Par rapport à l'ADN double brin il y a donc une variété structurale plus importante et il existe des molécules d'ARN qui reconnaissent spécifiquement d'autres biomolécules et des ARN capables d'une activité catalytique.

A température ambiante l'énergie thermique  $k_B T_{300K}$  est suffisante pour induire des ouvertures et re-fermetures locales des paires de base, on dit que les acides nucléiques respirent thermiquement. Il est utile d'avoir des barrières d'énergie de quelques  $k_B T$ , pour permettre une régulation fine des interactions et des réactions à la température ambiante.

### Protéines

Ce sont les protéines qui effectuent la grande majorité des activités cellulaires. Une cellule typique de mammifère peut contenir 10000 types de protéines différents. Elles accélèrent des réactions métaboliques (enzymes), donnent une stabilité mécanique (filaments), ont des fonctions de régulation (hormones, activateurs et suppresseurs), et forment la machinerie pour les mouvements (moteurs moléculaires).

Les protéines sont polymérisées linéairement à partir de monomères d'acides aminés. Chaque acide aminé possède un groupe amine NH<sub>2</sub> et un groupe carboxyle COOH, les deux sont séparés par l'atome carbone  $\alpha$ . Un résidu R est lié à l'atome carbone  $\alpha$ . Dans le polymère protéine les acides aminés sont joints par une simple liaison C- N, la liaison peptidique. La protéine a une orientation (comme les acides nucléiques). Sur le ribosome elle est toujours synthétisée dans le sens N-terminal vers C-terminal.

Dans les cellules biologiques on trouve 20 acides aminés différents (20 résidus R différents). Trois nucléotides successifs de l'ARN messager codent un acide aminé. Le code génétique est dégénéré :  $4^3 = 64$  combinaisons codent pour 21 évènements (20 acides aminés et un codon  $\ll$  stop $\gg$ ).

A chaque séquence (structure primaire) correspond une structure tridimensionnelle unique. Ceci explique la grande diversité des fonctions des protéines. Deux structures secondaires apparaissent souvent, l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ . Ces structures secondaires maximisent le nombre de liaisons hydrogènes. L'hélice  $\alpha$  porte 3.6 résidus par révolution, son diamètre est de l'ordre de 0.5 nm, son pas est 0.56 nm, son squelette C-C-N se trouve à l'intérieur, les résidus se trouvent à l'extérieur. Des liaisons hydrogènes s'établissent entre les atomes d'une liaison peptide et celles situées juste au-dessus.

Chaque poly-peptide d'un feuillet  $\beta$  assume une conformation étirée et pliée. La position des plis correspond aux positions des atomes carbone  $\alpha$ . Les résidus R sont orientés successivement vers le haut et vers le bas. Un feuillet  $\beta$  est constitué de plusieurs brins parallèles, liés par des liaisons hydrogènes. Les brins voisins peuvent être orientés dans le même sens (même orientation N-terminal vers C-terminal) ou dans le sens inverse. La période des plis est de ~0.7 nm, l'épaisseur de la feuille est ~0.5 nm, et la distance entre brins parallèles voisins est de ~0.5 nm.

L'arrangement 3D des hélices et feuillets est appelé la structure tertiaire. Souvent les hélices  $\alpha$  sont représentées par des hélices et les feuillets  $\beta$  par des flèches parallèles. La flèche indique la direction du N-terminal vers C-terminal. Les différentes structures secondaires s'arrangent dans l'espace pour former ce qu'on appelle la structure tertiaire. Quand plusieurs chaînes de polypeptide s'associent pour former une protéine, on appelle ce dernier niveau d'organisation la structure quaternaire. La diffraction des rayons X, technique mentionnée déjà dans le contexte de la decouverte de la double hélice d'ADN, joue un rôle primordial dans la determination des structures des protéines.

La taille des protéines varie de quelques dizaines d'acides aminés (aa) à plusieurs micromètres. L'insuline, qui consiste en deux chaînes de 21 et 30 aa seulement a été la première protéine séquencée (par Sanger et collaborateurs à Cambridge au début des années 1950). La taille typique d'un anticorps ou enzyme est de 1000 aa  $\sim 100 \text{ kD} \sim 10 \text{ nm}$  et les filaments atteignent des longueurs de plusieurs microns.

### Lipides et membranes

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la cellule est divisée en compartiments. Les membranes séparent différentes parties au sein de la cellule et aussi l'intérieur de la cellule du milieu extra cellulaire. Les phospholipides sont les briques élémentaires de la membrane. Chaque molécule possède une tête polaire (hydrophile) et deux queues non polaires (hydrophobes). Afin de minimiser l'énergie libre ces amphiphiles forment des bicouches avec les queues à l'intérieur et les têtes vers les milieux aqueux des deux côtés de la membrane. L'épaisseur de la bicouche est de 5-10 nm.

Les petites molécules hydrophobes et neutres passent facilement à travers la bicouche lipidique. Les petites molécules polaires comme les molécules d'eau la traversent plus difficilement du fait de leur aversion pour la partie hydrophobe au milieu de la bicouche. La bicouche est étanche pour les ions, les sucres, les protéines et d'autres grandes molécules.

Pour réguler le passage de sucres, de biomolécules et d'ions la membrane biologique héberge une multitude de protéines. Ces protéines souvent traversent la bicouche (protéines trans-membranaires) et permettent entre autres d'établir d'une façon spécifique et contrôlée des différences de concentrations entre les deux faces de la membrane.

Les phospholipides forment une sorte de matrice bidimensionelle liquide, deux molécules voisines de la même couche peuvent facilement échanger leurs positions. Ce caractère liquide est exploité dans le mouvement d'une cellule sur un substrat solide, et permet le mouvement des protéines transmembranaires.

### 1.4 Energie et entropie, la cellule ne viole pas la seconde loi de la thermodynamique

La membrane plasmique marque la frontière entre l'intérieur de la cellule (le cytoplasme) et le milieu extracellulaire. Cette frontière nous amène à la question physique suivante. Est-ce que l'organisation qui apparaît lors du développement d'une cellule se trouve en contradiction avec la seconde loi de la thermodynamique? Cette loi stipule qu'un système isolé évolue toujours vers une augmentation de son entropie S, c'est à dire vers une augmentation de désordre. Si on admet que la cellule, l'unité structurale de la vie, obéit aux lois de la physique statistique, alors on doit conclure qu'elle ne peut pas être isolée. Et effectivement elle est en contact thermique et chimique avec l'extérieur. Il convient d'utiliser l'ensemble canonique pour écrire cette situation et le système évolue vers une diminution de son énergie libre F = E - TS. Typiquement une cellule qui se structure correspond à une situation où  $\Delta F < 0$  et  $\Delta S < 0$  (l'ordre augmente). Comme l'entropie du système total ne diminue pas l'entropie du milieu extracellulaire augmente. En d'autres termes la cellule émet de la chaleur  $T\Delta S$ . Pendant un certain temps elle peut le faire en diminuant son énergie interne E, mais pour assurer un régime stationnaire (qui n'est pas un régime d'équilibre thermodynamique) elle doit importer de l'énergie. La cellule animale importe l'énergie sous forme de molécules. Elle absorbe des molécules à fort contenu énergétique (sucres) et éjecte des molécules à faible contenu énergétique (CO<sub>2</sub>). Les derniers sont les produits de la décomposition chimiques des premiers. Le cycle complexe des réactions correspondantes à lieu dans les mitochondries. Chez les plantes il y a aussi l'absorption des photons : la photosynthèse converti l'énergie  $E = \hbar \omega$  en molécules énergétiques, notamment des molécules d'ATP. La source fondamentale qui donne l'énergie pour la formation et l'activité des structures biologiques est le soleil.

A température ambiante l'énergie  $k_BT$  est égale à 25 meV ou 4 pN nm. L'intervalle d'énergie de 3 ordres de grandeur, entre 1 et 1000  $k_BT$  est pertinent pour les processus moléculaires de la cellule. L'énergie de liaison d'une liaison non covalente dans l'eau est quelques  $k_BT$ , l'hydrolyse d'ATP donne 20  $k_BT$ , le photon visible utilisé dans la photosynthèse correspond à ~120  $k_BT$ , l'énergie d'une simple liaison covalente C-C est 140  $k_BT$  et l'oxydation complète d'une glucose donne 1200  $k_BT$ . L'énergie consommée par un moteur moléculaire est d'une dizaine de  $k_BT$  par pas d'ordre la dizaine de nm. L'intervalle d'énergie correspondant aux interactions spécifiques entre biomolécules s'étend de quelques  $k_BT$  à quelques dizaines de  $k_BT$ .

La molécule d'ATP (adénosine triphosphate) est hydrolysée dans beaucoup de réactions biochimiques. Une molécule d'ATP et une molécule d'eau sont clivées donnant une molécule d'ADP, un phosphate inorganique  $P_i$  et un proton H<sup>+</sup>. En milieu cellulaire cette réaction libère  $\Delta G = -20 \text{ k}_B \text{T}$  ( $\Delta G_0 = 12.4 \text{ k}_B \text{T}$  à l'équilibre). L'homme produit (et consomme) 40 kg d'ATP par jour.

### 1.5 Catalyse enzymatique : la loi de Michaelis-Menten.

Malgré cet important changement d'énergie favorable l'ATP ne s'hydrolyse que lentement à cause d'une barrière d'énergie importante. Que ce se passe-t-il lorsque l'énergie stockée dans l'ATP est nécessaire? La cellule utilise un catalyseur biologique, un enzyme. L'enzyme accélère la réaction en baissant la barrière d'énergie.

Considèrons un enzyme E qui interagit avec un substrat S suivant la réaction chimique

$$E + S \xrightarrow[k_{-1}]{\sim} ES \xrightarrow[k_{-1}]{\sim} E + P.$$
(1.1)

L'enzyme est un catalyseur qui n'est pas affecté par la réaction, la réaction globale est  $S \to P$ . Comme il n'y a pas de chemin  $k_{-2}$ , le taux de production du produit P est donné par

$$\frac{dP}{dt} = k_2 [ES]. \tag{1.2}$$

On cherche donc à calculer la concentration [ES] de l'état intermédiaire avec l'enzyme fixé sur le substrat. L'Eq.1 nous donne l'évolution temporelle de cet état ES,

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$
(1.3)

A temps suffisament longue la concentration [ES] atteint un régime stationaire :  $\frac{d}{dt}[ES] = 0$ . Injection dans l'Eq.3 donne la concentration en régime stationnaire,

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] = \frac{1}{K_m} [E][S].$$
(1.4)

On veut exprimer ce résultat en terme de concentrations totales, les quantités d'enzyme  $[E_t]$  et de substrat  $[S_t]$  mis en réaction à l'instant t = 0,

$$[S_t] = [S] + [ES] \tag{1.5}$$

$$[E_t] = [E] + [ES] \tag{1.6}$$

On suppose qu'il y a peu d'enzymes par rapport au substrat  $[E_t] \ll [S_t]$  et que la réaction est suffisament lente pour que le régime stationaire est atteint avant que [P] devient non négligable par rapport à  $[S_t]$ . Dans ce cas, nous avons

$$[S] = [S_t]. (1.7)$$

Injection de (6) et (7) dans (4) donne

$$[ES] = \frac{1}{K_m} ([E_t] - [ES]) [S_t]$$
  
=  $\frac{1}{K_m + [S_t]} [E_t] [S_t].$ 

Avec l'équation (2) nous parvenons à l'expression de Michaelis-Menten pour la vitesse  $v = \frac{d[P]}{dt}$  de la réaction (1),

$$v = k_2 [E_t] \frac{[S_t]}{K_m + [S_t]} = v_{max} \frac{[S_t]}{K_m + [S_t]}.$$
(1.8)

Cette rélation à deux paramètres, décrit bien la cinétique observée dans un grand nombre de réactions enzymatiques, qui souvent sont beaucoup plus compliquées que le schéma (1). En fait, on peut montrer que tout schéma unidimensionel avec une dernière étape irréversible donne la dépendance en concentration  $[S_t]$  de l'éq.8. Le paramètre  $v_{max}$ , la **vitesse maximale**, est le taux de production de concentration (en m<sup>-3</sup>s<sup>-1</sup>) maximal, i.e. donne le niveau du plateau de saturation. La **constante d'affinité**  $K_m$  (en m<sup>-3</sup>) caractérise le régime de faible concentration, où v augmente linéairement avec  $[S_t]$ . Elle est la concentration à laquelle le taux de production atteint la moitie de sa valeur maximale.



**Figure 1.3.** Cinétique enzymatique selon Michaelis-Menten : représentation schématique de la rélation 1.8.

Regardons l'exemple de la décomposition de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette réaction est énergétiquement très favorable ( $\Delta G_0 = -40 \text{ k}_B \text{T}$ ) mais lente dans une solution pure : à 25°C, une solution 1M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se décompose avec un taux de 10<sup>-8</sup> M/s, ceci correspond à une décomposition de seulement 1% de l'échantillon après deux semaines. L'ajout de l'enzyme catalase à concentration de  $[E_t]=1$  mM augmente le taux par 10<sup>12</sup>, 1% de l'échantillon se décompose en une  $\mu$ s ! H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ici le substrat et son taux de variation est la vitesse de réaction v (ici 10<sup>4</sup> M/s). Comme prédit par Eq.1.8 pour la plupart des enzymes la vitesse v monte d'abord linéairement avec la concentration de substrat  $[S_t]$  et sature ensuite. La valeur de  $[S_t] = 1$ M dans cet exemple correspond à la saturation :  $v_{max} = 10^4$  M/s est la vitesse maximale et le taux de «turnover»,  $v_{max}/[E_t] = k_2 = 10^7$  s<sup>-1</sup>, quantifie combien de substrat l'enzyme peut convertir par unité de temps lorsque la concentration de substrat n'est pas limitante ( $[E_t]$  : concentration de l'enzyme). La catalase est un champion de vitesse, 100-1000 s<sup>-1</sup> est une valeur plus typique pour le taux de «turnover» d'un enzyme.

### **1.6** Quelques processus enzymatiques

### **1.6.1** Moteurs moléculaires et filaments

La kinésine est un exemple d'un enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP. L'énergie chimique obtenue est utilisée pour effectuer un travail mécanique. Il s'agit d'un moteur moléculaire qui se déplace sur des microtubules. Les microtubules sont des filaments constitués de deux protéines différentes, les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces tubes de 25 nm de diamètre peuvent atteindre des longueurs de plusieurs microns. Ils servent à stabiliser la cellule mécaniquement et aussi comme rails pour le transport actif de biomolécules par des moteurs. La kinésine avance avec un pas de 8 nm compatible avec la période des dimères de tubuline et hydrolyse une molécule d'ATP par pas. Cette information a été obtenue dans les dernières années grâce à des études sur molécule unique.

Il existe plusieurs types de moteurs et de filaments. Le battement des cils sur la surface d'une bactérie par exemple fait intervenir un assemblage de microtubules et de moteurs dynéine. Dans les muscles ce sont des filaments d'actines et des moteurs myosine qui convertissent l'énergie chimique en travail mécanique à l'échelle de la molécule. Rappelons enfin, qu'il peut y avoir toute une hierarchie de structures entre l'échelle du nanomètre au micron que nous considérons dans ce cours (activités des moteurs moléculaires) et l'action macroscopique (par exemple le mouvement d'un bras).

#### **1.6.2** Processus élémentaires du vivant

Revenons au flux d'information dans la cellule et regardons maintenant les processus enzymatiques associés. Le processus pour dupliquer l'ADN s'appelle la réplication. Lors de la transcription, l'information contenue dans l'ADN est transférée à une molécule d'ARN, appelée ARN messager (ARNm). L'ARN messager est ensuite traduit en protéine. La cellule peut réguler cette synthèse de protéine au niveau de la transcription et au niveau de la traduction.

#### Réplication

L'enzyme qui synthétise l'ADN nouveau à partir de l'ADN existant s'appelle ADN polymérase, mais souvent une multitude d'autres enzymes participent à la réplication. Il y a des topoisomérases qui enlèvent des contraints de rotation, des hélicases qui séparent les deux brins de la double hélice, des protéines qui se fixent sur l'ADN simple brin pour empêcher que l'ADN ne se referme. L'ADN polymérase a besoin d'une amorce simple brin et travaille seulement dans un sens. Sur un brin la polymérisation se fait de façon processive. Sur l'autre elle se fait par morceaux et l'enzyme ligase introduit des liaisons covalentes entre les morceaux.

#### Transcription

La transcription est assurée par une ARN polymérase. La séquence de l'un des deux brins de l'ADN est copiée dans le sens 5' vers 3'. La polymérase reconnaît une séquence spécifique de démarrage sur le brin codant, assure l'ouverture locale de la double hélice (formation d'une bulle de dénaturation) et synthétise l'ARN complémentaire de façon processive (plusieurs milliers de nucléotides). L'ARN polymérase du bactériophage T7, par exemple, a un diamètre d'environ 10 nm et une seule chaîne polypeptidique de 883 acides aminés. Elle synthétise l'ARN à un taux de 250 nucléotides/s ce qui correspond à une vitesse de déplacement sur l'ADN de 80 nm/s. La polymérisation des ribonucléotides est elle même la source d'énergie. La structure de l'enzyme ressemble à une main droite. En phase d'élongation, i.e. pendant la synthèse de l'ARN, la main est fermée, l'ADN se trouve entre le pouce et les doigts et l'ARN sort sur le côté.

### Traduction

La traduction se fait sur le ribosome. Ce complexe de protéines et d'ARN ribosomiques (ARNr) est composé d'une grande et d'une petite sous unité qui se fixent sur l'ARNm. Les acides aminés à ajouter à la protéine naissante sont apportés par des molécules ARN de transfert (ARNt). La vitesse de synthèse est  $\sim 20$  aa/s et le taux d'erreur est seulement de 1/10000. Le ribosome est relativement grand et complexe.

Son poids moléculaire est de 2.6 Mega Dalton (2/3\*2.6 Mega Dalton pour la grande sous unité) dont 2/3 RNA et 1/3 protéines. La grande sous unité inclut 31 protéines et 3045 nucléo tides d'ARN (deux molécules d'ARN, le 23s ARNr avec 2923 nt et le 5s ARNr avec 122 nt) et son diamètre est  $\sim$ 25 nm. L'ARNr a un rôle catalytique, les protéines servent surtout dans l'assemblage et le maintien de la structure du ribosome.

Pour former une protéine biologiquement active le polypeptide linéairement synthétisé doit encore se replier correctement. Ce repliement ne peut pas se faire par une recherche aléatoire dans l'espace des conformations possibles. Une estimation donne un temps de l'ordre de  $10^9$  années, même pour une protéine relativement petite de 100 acides aminés. Le repliement des protéines n'est pas entièrement compris et reste un sujet important de recherche. La vision actuelle est celle d'une descente quasi continuelle en énergie dans un espace multi dimensionnel, représenté en trois dimensions par un entonnoir. Ceci implique l'absence de piège profond sur le chemin (et dans son voisinage). On pense que cette contrainte était un critère de sélection dans l'évolution. Aujourd'hui on commence à synthétiser des protéines avec des séquences différentes de celles trouvées dans le vivant. On tient compte du repliement dans le design. En optimisant pour le repliement on a récemment synthétisé des protéines artificielles qui se replient légèrement plus vite que la  $\mu$ s.

Souvent, et notamment pour les grandes protéines, la nature utilise d'autres protéines (dites chaperons) comme aide au repliement. Ces molécules se fixent à des endroits spécifiques (souvent aux parties hydrophobes) de la protéine naissante pour modifier les interactions intra moléculaire et empêcher ainsi la formation d'une structure de repliement intermédiaire gênante pour arriver à la configuration recherchée.

### 1.7 Conclusions du chapitre

- 1. Le nanomètre est l'ordre de grandeur de taille pour les protéines globulaires, le diamètre de la molécule d'ADN et l'épaisseur des membranes. Le diamètre de la cellule biologique et la longueur des filaments du cytosquelette sont de l'ordre de quelques micromètres.
- 2. L'intervalle d'énergie entre 1 et 1000  $k_B$ T est pertinent pour les processus moléculaires de la cellule.
- 3. La cellule biologique peut évoluer dans un régime stationaire, mais pas à l'équilibre thermodynamique. Elle a besoin d'importer de l'énergie.
- 4. Une multitude d'enzymes est impliquée dans les réactions biochimiques de la cellule. La cinétique correspondante est souvent bien décrite par la rélation de Michaelis-Menten.

### Chapitre 2

### Hydrodynamique pour la cellule

Nous avons précédemment insisté sur le fait que la cellule était un environnement dynamique, hors d'équilibre et en mouvement. Nombre de régions à l'intérieur de la cellule apparaissent comme liquide (essentiellement une solution aqueuse) et il est tentant de faire appel à l'hydrodynamique pour décrire les mouvements et écoulements correspondants. Ce chapître présente quelques éléments simples constituant un bagage minimal en mécanique des fluides aux petites échelles, adapté à la perspective de ce cours. Nombre d'aspects un peu élaborés (écritures tensorielles, calculs exacts) sont passés sous silence, mais sont disponibles dans les manuels classiques de mécanique des fluides.

Les éléments donnés dans ce chapître concernent l'écoulement d'un fluide homogène unique dans diverses situations et des illustrations à l'échelle et à l'environnement cellulaire seront mentionnées. Toutefois il est important de garder à l'esprit que l'intérieur d'une cellule n'est pas une poche remplie d'un liquide homogène simple : il comporte de nombreuses inclusions, qui ne sont pas distribuées homogènement, et qui pour certaines peuvent se déformer élastiquement sous l'effet des écoulements, voir générer des contraintes mécaniques à partir d'énergie chimique (ce que nous verrons au chapître 7). La description de la mécanique "visco-élastique" résultante est l'objet d'études actives. La description de mécanismes par la simple mécanique des fluides homogènes présentée ici est donc toujours soumise à précautions.

En revanche, les descriptions hydrodynamiques exposées dans ce chapître sont souvent quantitativement pertinentes pour analyser des expériences de biophysique *in-vitro* où le solvant environnant les objets étudiés est une solution aqueuse bien contrôlée.

### 2.1 Viscosité et nombre de Reynolds

Commençons ces investigations hydrodynamiques par une petite expérience macroscopique. Tourner une cuiller dans une tasse de café puis dans un pot de miel liquide amène à constater des différences entre ces deux situations de géométries pourtant similaires : différences quantitatives d'abord (il est plus dur de tourner la cuiller dans le miel), mais également qualitatives (des petits tourbillons en surface pour le café mais pas pour le miel, quand on immobilise la cuiller l'écoulement s'arrête immédiatement pour le miel mais perdure quelques secondes pour le café).

La source intuitive de ces différences qualitatives de comportement est une différence structurelle entre ces des deux liquides, et plus précisément le fait que le miel est nettement plus *visqueux* que l'eau. Voyons maintenant plus précisément si et comment la différence de viscosité (que nous allons définir) peut expliquer une telle variation qualitative des phénomènes.

### 2.1.1 Viscosité

Revenons à la **définition de la viscosité.** Un liquide est placé entre deux plaques parallèles distantes de H. On déplace la plaque supérieure à une vitesse V en maintenant l'autre fixe (Figure 2.1). Ce mouvement entraîne le liquide, et il s'établit en régime permanent un cisaillement au sein de celui-ci avec des couches de liquides qui "frottent" contre leurs voisines parce qu'elles vont à des vitesses différentes.

Considérons une couche de liquide : elle est en équilibre mécanique sous l'effet des forces antagonistes de la couche immédiatement supérieure (qui va plus vite et tend à l'entraîner vers l'avant) et de la couche immédiatement inférieure (qui va moins vite et la tire par friction vers l'arrière car elle recule dans le référentiel de la couche considérée). La force exercée sur la plaque du haut est ainsi transmise de couche en couche à celle du bas.



FIG. 2.1 – Cisaillement simple entre deux plaque.

A petite vitesse, la force sur la plaque du bas est proportionnelle à la vitesse V (sauf pour des fluides pathologiques) et à la surface des plaques S. En fait elle est plus précisément proportionnelle au gradient de vitesse imposé par les plaques V/H: si on considère une géométrie d'épaisseur 2H avec une vitesse 2V, la situation au dessus de la plaque du bas est inchangée, ainsi donc que la force. Par définition, le coefficient de proportionnalité entre la force par unité de surface (ou *contrainte*, ou *stress* en Franglais)  $\sigma$  et le gradient de vitesse est la viscosité  $\eta$ :

$$F/S = \sigma = \eta(V/H) \tag{2.1}$$

Cette contrainte existe en fait dans tout le liquide, et l'équilibre mécanique précédemment décrit pour une couche de petite épaisseur dz conduit à la loi locale  $\sigma = \eta(dv/dz)$  ou v est la vitesse horizontale locale.

Ce type de relation linéaire reste valable jusqu'à ce que les gradients de vitesse deviennent trop grands, typiquement comparables à la fréquence des réarrangements internes du fluide, situation dans laquelle l'écoulement perturbe notablement la structure et les propriétés du fluide. Pour des liquides simples comme l'eau (fréquences internes très élevées) ce comportement linéaire est pratiquement toujours applicable. De tels fluides, à large gamme de comportement linéaire sont souvent qualifiés de "Newtoniens".

La viscosité s'exprime dans le système international en Pa.s (Pascal seconde), l'unité historique étant le Poise (1 Poise = 0.1 Pa.s). Elle augmente en général avec la pression, elle augmente avec la température pour les gaz (plus de collisions), mais diminue avec la température pour les liquides simples (car la plupart des mouvements impliquent localement le passage de barrières d'activation, qui devient plus faacile à haute température). La viscosité de l'eau dans les conditions ambiantes est  $\eta_{eau} \simeq 10^{-3}Pa.s = 1 cPoise$ , celle du miel peut aller de quelques centaines à quelques milliers de Pa.s.

En revenant à l'observation qualitative initiale, y a-t-il des fluides visqueux qui coulent d'une certaine façon et des fluides moins visqueux qui coulent d'une autre façon (qualitativement différente), séparés alors par une viscosité critique (qui se trouverait entre les deux valeurs citées pour l'eau et le miel)? En fait ce n'est pas le cas comme la discussion qui suit va le montrer.

### 2.1.2 Nombre de Reynolds

Considérons par exemple une sphère de rayon R qu'un observateur extérieur maintient fixe au sein d'un fluide en écoulement à une vitesse V (nous verrons plus loin dans le cours différentes façons de réaliser ceci pour des objets micrométriques : pincettes optiques et magnétiques par exemple). Essayons d'estimer la force exercée par l'écoulement sur la sphère (opposée à celle que l'observateur doit fournir pour la maintenir fixe).



FIG. 2.2 – Une sphère de rayon R fixe dans un écoulement à vitesse V subit une force qui tend à l'entraîner vers la droite.

Une première contribution est due au fait que la sphère encaisse le "choc" du fluide qui la "percute", soit en gros une masse de fluide ~  $\rho * \pi R^2 * V$  par unité de temps (en ayant noté  $\rho$  la densité du fluide, un nouvel acteur dans notre discussion). Cette masse subit au cours du "choc" une chute de vitesse d'ordre V. Ceci correspond à un transfert de quantité de mouvement par unité de temps  $\Delta p/\Delta t \sim \pi \rho R^2 V^2$ , qui est directement une force sur l'objet d'après l'équation de Newton. On peut également retrouver ce résultat en utilisant l'équation de Bernouilli qui prédit des variations de pression d'ordre  $\rho V^2$ , qui appliquées à une surface d'aire ~  $\pi R^2$  conduit au même résultat. On a donc une force d'origine inertielle  $F_{in}$  exercée sur la sphère :

$$F_{in} \sim \rho R^2 V^2 \tag{2.2}$$

Une deuxième contribution est due aux forces visqueuses. Le fluide est obligé de contourner la sphère, ce qui conduit à des variations de la vitesse d'ordre V sur des distances d'ordre R, d'où d'après l'équation (1) des contraintes d'ordre  $\eta V/R$ , et donc une force sur l'objet d'ordre  $\sim \pi R^2 * \eta V/R$ . En oubliant les préfacteurs la force visqueuse est donc :

$$F_{vis} \sim \eta R V \tag{2.3}$$

Comparer ces deux forces fait apparaître un nombre sans dimension, le nombre de Reynolds, souvent noté  $Re = F_{in}/F_{vis}$ :

$$Re = \rho V R / \eta \tag{2.4}$$

La distinction entre deux types de comportements devient alors :

- à faible nombre de Reynolds (grandes viscosités, petites tailles, petites vitesses), les effets visqueux dominent, les effets inertiels sont négligeables.

- à haut nombre de Reynolds (*petites viscosités, grandes tailles, grandes vitesses*), les effets visqueux sont négligeables.

C'est ce critère qui sépare des phénoménologies différentes de façon précise (les tourbillons et la persistance des écoulements après l'arrêt du forçage par la cuiller sont des signatures des effets inertiels). La caractérisation par la seule viscosité n'est valable qu'à géométrie et vitesse fixée !

Note : La géométrie du problème considérée est particulièrement simple avec en particulier une seule longueur R. Dans des géométries plus compliquées avec des dimensions très différentes dans différentes directions de l'espace, une analyse plus fine est nécessaire pour déterminer quelle longueur doit intervenir dans l'écriture de Re.

### 2.1.3 Ordres de grandeur

Examinons quelques exemples :

1 - Cuiller dans café : ordres de grandeur typiques : V = 1cm/s, R = 1cm,  $\rho = 10^3 kg/m^3$ ,  $\eta_{eau} = 10^{-3}Pa.s$ . Ceci donne  $Re \simeq 100$ .

2- Cuiller dans miel : très schématiquement, même nombres qu'avant avec  $\eta > 1Pa.s$ , d'où Re < 0.1.

3- Nageur dans une piscine pleine d'eau : V = 1m/s, R = 1m, d'où  $Re = 10^6$ ! Remarque : appliquer ce

critère la natation dans un liquide comme le miel conduit à  $Re = 10^3$  et est donc similaire à celle de la natation dans l'eau (ceci a de fait été vérifié en faisant nager des gens dans une piscine remplie de liquide très visqueux, mais tel que  $Re \gg 1^{-1}$ ).

4- Natation d'une bactérie dans l'eau :  $R = 1\mu m$ ,  $V = 10\mu m/s$ , d'où  $Re = 10^{-5}$ .

Dans les cas 1 et 3, on peut parfaitement négliger les effets visqueux, alors qu'ils dominent largement les effets inertiels dans les deux autres cas. La natation des bactéries est donc qualitativement dans le même régime que le mouvement de la cuiller dans le miel à notre échelle.

### 2.1.4 Force critique

Il est intéressant de remarquer que la séparation entre régimes à fort et à faible nombre de Reynolds correspond en fait à une séparation en termes de forces (et non pas de viscosité), et que la caractéristique importante correspondante est une *force critique* :

$$f_c = \eta^2 / \rho \tag{2.5}$$

qui est caractéristique de chaque fluide. En effet, en reprenant les équations (2.2)-(2.4) ci dessus, on voit que  $F_{in} = Re^2 f_c$  et  $F_{vis} = Re f_c$ , de sorte que dans le régime visqueux  $Re \ll 1$  la force totale F est  $F \simeq F_{vis} \ll f_c$ , alors que dans le régime inertiel  $Re \gg 1$  elle vaut  $F \simeq F_{in} \gg f_c$ .

Pour l'eau  $f_c \simeq 10^{-9}N$ , bien au-delà par exemple des forces générées par les moteurs moléculaires dans la cellule (quelques pN souvent). Les systèmes que nous verrons dans ce cours évoluent donc dans le régime des faibles Re.

### 2.2 Friction dans le monde des petits nombres de Reynolds

A l'échelle de la cellule, dans des environnements aqueux, on est quasiment toujours dans des situations à faible nombre de Reynolds.

### 2.2.1 Formellement : relation force-vitesse

Dans ce schéma on peut négliger les effets inertiels, de sorte que la somme des forces sur un objet est nulle. Ce bilan des forces inclut évidemment les forces de friction hydrodynamiques, qui sont linéaires en la vitesse de l'objet.

Plus précisément, si on applique une force  $\mathbf{F}$  à un objet dans le liquide, il acquiert instantanément une vitesse  $\mathbf{V}$  déterminée par l'équilibre des forces sur l'objet (pas d'effets inertiels) :

$$\mathbf{F} - \mathbf{C} \cdot \mathbf{V} = \mathbf{0} \tag{2.6}$$

où  $\mathbf{C}$  est le tenseur de friction de l'objet qui dépend de sa forme et de sa taille. Le tenseur inverse  $\mathbf{M} = \mathbf{C}^{-1}$  est souvent appelé tenseur de mobilité hydrodynamique, qui décrit la vitesse  $\mathbf{V} = \mathbf{M}$ .F atteinte par l'objet sous l'effet d'une force.

Remarque 1 : en toute généralité, il faut écrire que la somme des couples exercés sur l'objet est également nulle. Ceci conduit à une écriture plus complexe mais toujours linéaire qui relie le couple  $\Gamma$  et la force **F** exercés sur l'objet d'une part, à ses vitesses de rotation  $\Omega$  et de translation **V**.

Remarque 2 : Moyennage par l'agitation thermique : comme nous le verrons dans le chapitre sur le mouvement Brownien, les petits objets sous l'effet de l'agitation thermique échantillonnent assez rapidement leurs différentes orientations possibles (temps d'ordre  $\eta R^3/k_B T$  pour un objet de taille R et donc moins d'une microseconde pour une protéine de 10 nm de diamètre). Si l'on s'intéresse au mouvement à plus long temps de l'objet, il n'est souvent pas nécessaire de garder une description tensorielle, car le tenseur **C** se moyenne rapidement en un tenseur scalaire.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>"Will humans swim faster or slower in syrup?", B. Gettelfinger, E.L. Cussler, AIChE J., 50, 2646-2647 (2004)

### 2.2.2 Pratiquement : formule de Stokes

Un résultat classique concerne le cas d'une sphère de rayon R, où par symétrie le tenseur de friction est un scalaire  $\mathbf{C} = C\mathbf{I}$ . Ce scalaire C appelé *coefficient de friction* est donné par la formule de Stokes :

$$\mathbf{F} = C\mathbf{V} = 6\pi\eta R\mathbf{V}.\tag{2.7}$$

L'origine qualitative de ce résultat est l'argument donné dans la section 1.2 de ce chapitre (au dessus de l'equation (2.3)). Cet argument permet en fait de comprendre pourquoi le résultat n'est pas qualitativement changé si la forme de l'objet n'est pas exactement une sphère.

De fait pour un objet non sphérique, la formule de Stokes permet d'avoir une bonne estimation des effets de friction à condition d'utiliser pour R la moitié de la plus grande dimension de l'objet. Elle donne alors l'ordre de grandeur des valeurs propres du tenseur de friction  $\mathbf{C}$ , qui sont toutes comparables (même pour des objets très anisotropes).

### 2.2.3 Ordres de grandeur dans le monde cellulaire

1- Application et avertissement : pour déplacer dans l'eau ( $\eta = 10^{-3}Pa.s$ ) une petite vésicule de rayon 50 nm à une vitesse de  $10 \,\mu m/s$ , il faut d'après la formule de Stokes exercer une force d'ordre  $0.01 \,pN$ . Des protéines motrices, les kinésines, qui effectuent cette tâche au sein de la cellule, mobilisent des forces de quelques pN. Pourquoi cette différence ? Peut-être parce que les kinésines remplissent également d'autres tL'ches nécéssitant des forces plus grandes, mais également parce que la cellule est truffée d'objets divers (protéines, polymères, etc ...) qui rendent le milieu (cytoplasme) beaucoup plus encombré que l'eau, et donc les efforts pour déplacer des objets en son sein sont beaucoup plus grands que l'estimation donnée par la formule de Stokes (avec la viscosité de l'eau)! En vérité, comme indiqué en préliminaire à ce chapitre, il n'est même pas possible de décrire le milieu intracellulaire par une simple viscosité effective.

2- Autre application : si on suppose que la densité d'une protéine de taille R = 10 nm est environ 1.1 fois celle de l'eau, alors vous vérifierez aisément que sa vitesse de sédimentation sous l'effet de la gravité dans l'eau est d'ordre  $10^{-11} m/s$  (!) soit moins de  $0.1 \mu m/heure$ . Dans le cytoplasme sensiblement plus "visqueux" cette vitesse est encore beaucoup plus faible. On peut en général ainsi négliger l'effet de la gravité pour la plupart des phénomènes à l'échelle de la cellule, et la diffusion par agitation thermique (voir chapître 4) domine largement ces effets de sédimentation.

### 2.3 Quelques remarques complémentaires

A l'échelle cellulaire, on peut négliger les effet inertiels de sorte que les équations de l'hydrodynamique pour les écoulements aqueux se ramènent à une équation d'équilibre local des forces (conservation de la quantité de mouvement) :

$$-\nabla p + \eta \Delta \mathbf{v} + \mathbf{f}_{ext} = \mathbf{0} \tag{2.8}$$

où  $\mathbf{f}_{ext}$  est une densité de force qui représente les actions extérieures sur le fluide. L'équation exprime que la somme des forces sur chaque élément de volume est nulle : somme des forces mécaniques dues aux éléments de fluide voisins (forces de pression et forces visqueuses) et des forces extérieures directement exercée sur l'élément (par exemple électrique, magnétique..).

Par ailleurs, l'eau peut être considérée comme incompressible, de sorte que la pression p est en fait fixée par l'équation supplémentaire d'incompressibilité (divergence du flux de matière nulle) :

$$\nabla \mathbf{.v} = 0 \tag{2.9}$$

Pour résoudre le système d'équations résultant, il reste à y ajouter des conditions aux limites, dont en particulier la spécification qu'à une frontière "solide" (le bord d'un objet, une paroi, ..) la vitesse  $\mathbf{v}$ du fluide est égale à celle de la frontière.

Soulignons quelques propriétés importantes de ces équations :

- Ces équations sont linéaires. Des forces deux fois plus grandes génèrent des vitesses et des pressions deux fois plus grandes. On peut aussi superposer les solutions de plusieurs problèmes. De même, si des forces produisent un champ de vitesses  $\mathbf{v}(\mathbf{r})$ , leurs opposées produisent le champ  $-\mathbf{v}(\mathbf{r})$ . Ceci permet de prouver que la géométrie des lignes de courant autour d'un objet en mouvement ne dépend pas du sens du mouvement.
- Ces équations ne contiennent qu'une caractéristique du fluide, la viscosité  $\eta$ . En particulier elles ne contiennent pas d'échelles intrinsèques de longueur, de temps ou de vitesse. Une conséquence est que la forme des lignes de courant autour d'un objet en mouvement ne dépend pas de la taille de l'objet (ni de sa vitesse).
- Les forces sont dans ce monde reliées aux vitesses et non aux accélérations. Ceci impose des limitations aux organismes vivant à ces échelles quant à leur propulsion où la capture de nourriture. En particulier, les mouvements périodiques "réciproques" (c'est à dire mouvements périodiques où l'organisme adopte la même séquence de configurations à l'aller et au retour, mais dans l'ordre inverse) ne peuvent conduire à une progression nette. Impossible donc par ces stratégies de nager ou de ramener à soi une nourriture flottant dans les environs.
- Lorsqu'un objet se déplace sous l'effet d'une force F, il entraîne le fluide environnant (et les objet qui s'y trouvent). On parle souvent d'"interactions hydrodynamiques" entre objets. En fait le champ de vitesse autour d'un tel objet décroît loin de celui-ci comme  $v(r) \sim F/\eta r$  dans un milieu infini, et ses "interactions hydrodynamiques" sont donc à longues portée.

Note : un petit raisonnement permet de comprendre la décroissance algébrique lente de la vitesse mentionnée dans le dernier point. La force F appliquée à l'objet est transmise par friction au fluide. Si l'on considère une grande sphère de fluide de rayon r entourant l'objet, alors la somme des forces appliquées sur le fluide dans cette sphère doit être nulle. Cette somme comprend d'une part F appliquée par l'objet en son centre, d'autre part les contraintes hydrodynamiques exercées sur l'extérieur de la sphère (surface  $4\pi r^2$ ). Le tenseur de contrainte hydrodynamique à la périphérie de la sphère doit donc être d'ordre  $\sigma \sim F/r^2$ , et comme dans un monde visqueux  $\sigma \sim \eta \nabla v$ , on en déduit  $\nabla v \sim F/\eta r^2$  d'où  $v \sim F/\eta r$ .

### 2.4 Conclusions du chapitre

Aux échelles cellulaires, les effets inertiels sont négligeables, et la mécanique est donc régie par l'équilibre instantané des forces. Les efforts hydrodynamiques sont essentiellement dus aux frottements visqueux, et la force nécessaire à déplacer un objet peut être évaluée par la formule de Stokes. Cette hydrodynamique est qualitativement différente de l'hydrodynamique inertielle à laquelle nous sommes habitués.

Pour des expériences in vitro en solution aqueuse on peut généralement utiliser la viscosité de l'eau  $(\eta = 10^{-3} Pa.s.)$  et obtenir des descriptions quantitatives précises des écoulements.

Le milieu intracellulaire in-vivo est de par sa composition et son hétérogénéité beaucoup plus complexe à décrire. Des effets non-linéaires et visco-élastiques peuvent intervenir, ainsi que des écoulements activement générées par le cytoplasme. A petite échelle (submicronique), des estimations hydrodynamiques sont néanmoins souvent utilisées (à défaut de modèle permettant de décrire plus proprement la complexité sous-jacente) en ayant souvent recours à des viscosités effectives de 10 à 1000 fois plus grandes que celle de l'eau pour rendre compte de l'encombrement du milieu.

### Chapitre 3

### Cytoplasme et entropie

### 3.1 Introduction : la cellule est une soupe dynamique

Comme nous l'avons vu, la cellule renferme en son sein (délimité par sa membrane extérieure) une grande variété de structures complexes (noyau, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, mitochondries ,..) plus ou moins grandes, le reste étant souvent décrit par le terme de cytoplasme, qui s'il est essentiellement constitué d'eau (70%), contient également une quantité importante d'autres éléments : protéines, lipides, ions, molécules diverses ...

Dans le monde industriel, les formulateurs de peintures, d'encres et autres fluides composés savent qu'il faut souvent développer des trésors d'ingéniosité pour qu'un tel mélange reste homogène, sans précipitation de certains des constituants ou séparation de phase (comme celle d'un mélange eau-huile).

A l'évidence de tels phénomènes dans un contexte biologique seraient fatals à la vie de l'organisme, qui repose pour de multiples fonctions sur la possibilité de circulation des différents éléments au sein de la cellule.

Une spécificité de la cellule par rapport à une formulation industrielle, est qu'en plus du seul effet "brassant" de l'agitation thermique (quantifié par l'entropie), la cellule consomme en permanence de l'énergie pour maintenir dynamiquement sa structure et ses fonctions. Toutefois, l'agitation thermique reste un facteur essentiel pour permettre l'existence et la fluidité de cette soupe vivante.

Dans ce chapitre, nous proposons d'oublier pour un moment (seulement) le caractère hors-équilibre de la cellule et la consommation d'énergie associée, et d'examiner les concepts physiques qui permettent d'appréhender les effets entropiques sur des mélanges complexes à l'équilibre thermodynamique. Beaucoup de ces concepts ont été introduits pour décrire des fluides non biologiques <sup>1</sup>, mais nous verrons comment ils éclairent différents processus à l'œuvre dans la cellule. La description des aspects dynamiques associés à l'àgitation thermique fera l'objet du chapitre suivant.

### 3.2 Petites molécules, ions

### 3.2.1 Solubilité

Considérons par exemple la dissolution d'une espèce solide S (par exemple du sucre) dans l'eau. L'image classique est la suivante : tant que la concentration en sucre dans la solution est inférieure à une valeur  $c_s$ , tout sucre solide ajouté se dissout complètement. Si l'on ajoute trop de sucre, la concentration en solution se stabilise à la valeur  $c_s$  et le reste du sucre reste solide. Cet état correspond à un équilibre entre les deux phases "solide" et "en "solution", et donc à l'égalité des potentiels chimiques dans ces deux phases.

Lorsque ces deux phases coexistent, le potentiel chimique dans la phase solide  $\mu_{solide}(P,T)$  est donc égal au potentiel en solution, qui à faible concentration c s'écrit :

$$\mu = \mu_0(P,T) + k_B T \ln(c/c_0) \tag{3.1}$$

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>voir par exemple le livre : "Liquides : solutions, dispersions, émulsions, gels", de B. Cabane et S. Hénon, Editions Belin

où le deuxième terme proportionnel à  $k_BT$ , exactement comme pour un gaz parfait, quantifie l'entropie de translation des molécules de S dans l'eau (les degrés de liberté de positionnement du centre de masse dans la fonction de partition).  $\mu_0(P,T)$  (associé au terme de normalisation  $-k_BT \ln(c_0)$ ) quantifie l'énergie libre correspondant à l'insertion d'une molécule de S dans la solution.

Note : Dans beaucoup d'ouvrages de thermochimie on trouve plutôt  $\mu = \hat{\mu}_0(P,T) + RT \ln[S]$ . Cette écriture correspond à la même physique, mais suit des conventions plus classiques en chimie, où le potentiel chimique est rapporté à une mole d'éléments (d'où le  $R = N_A k_B$  de la loi des gaz parfaits plutôt que  $k_B$ ), et où [S] est le nombre de moles de S dissous par litre d'eau. La constante  $\hat{\mu}_0 = N_A(\mu_0(P,T) + k_BT \ln(N_A 10^3/c_0))$ , ainsi obtenue est appelée le potentiel standard.

L'égalité des potentiels dans les deux phases en coexistence  $\mu = \mu_{solide}$  conduit à une formule pour  $c_s$ , souvent appelé "produit de solubilité" (de A dans l'eau) :

$$c_s(P,T) = c_0(P,T) \exp(-\Delta \mu / k_B T)$$
(3.2)

où  $\Delta \mu = \mu_0 - \mu_{solide}$  correspond à la variation de potentiel chimique due au transfert d'une molécule de S dans l'eau, si l'on oublie le gain en entropie translationnelle. Cette variation est souvent (mais pas toujours) dominée par les contributions enthalpiques et est en général positive (voir la clarification dans la remarque plus bas). L'équilibre ci-dessus se présente donc souvent comme le combat classique d'effets énergétiques ou enthalpiques (opposés à la solubilisation) et d'effets entropiques favorisant le mélange (qui augmente le nombre de configurations possibles pour le système et donc l'entropie de translation).

Notez que tant que c est inférieur à  $c_s$ , le potentiel chimique en solution est plus faible que  $\mu_{solide}$ , et seule la phase dissoute est stable.

Conclusion : on peut dissoudre dans l'eau des molécules jusqu'à un seuil  $c_s$ , d'autant plus faible que  $\Delta \mu$  est grand. Si  $\Delta \mu$  est très faible, on peut atteindre des concentrations élevées (il faut alors corriger les formules (3.1) et (3.2) valables pour des solutions diluées).

#### Une remarque importante



FIG. 3.1 – Modèle unidimensionnel pour la solvatation. Dans l'image supérieure le soluté S et le solvant sont séparés. Si une molécule du soluté est dissoute dans le solvant, celà conduit à une situation comme celle de l'image inférieure. Le bilan hors entropie de translation (liberté de positionnement de la molécule dissoute) correspond à la modification de quatre contacts, indiqués par les flèches.

Examinons un modèle très simple pour éviter une confusion dangereuse. Considérons un modèle 1D sur réseau, avec une ligne de sites équidistants occupés chacun par une molécule d'eau w ou une molécule de soluté S. On considère que seules les molécules voisines interagissent, avec une énergie libre  $e_{ww}$ ,  $e_{wS}$  ou  $e_{SS}$  suivant la nature des voisins. Commençons avec le S à gauche et l'eau à droite (Figure 3.2.1 gauche). Alors "dissoudre" une molécule de S dans l'eau conduit au total à détruire une liaison we et une liaison SS pour former deux nouvelles liaisons wS (voir figure). Bilan pour le coût effectif de dissolution :  $\Delta \mu = 2[e_{Sw} - (e_{SS} + e_{ww})/2].$ 

Conclusion valable au-delà de ce modèle : le "coût"  $\Delta \mu$  (en général positif, sauf pour des systèmes miscibles en toutes proportions), n'est donc pas celui de la formation des liaisons Sw, mais la différence entre celui-ci et celui de la suppression de liaisons existantes dans les deux milieux séparés. Il est ainsi incorrect de dire que l'eau et l'huile se mélangent mal parce que l'eau et l'huile "ne s'aiment pas". En fait il y a des attractions entre molécules d'eau et molécules d'huile, donc schématiquement  $e_{eau-huile}$  est bien négatif (gain énergétique). Mais il en existe de plus fortes dans chacun des liquides séparément, en particulier entre molécules d'eau du fait des liaisons Hydrogène.

De la figure ci-dessus il est clair que dans la dissolution d'une molécule de S, on gagne la liberté de pouvoir la placer où l'on veut sur la droite. Ce gain entropique domine jusqu'à ce que l'on atteigne la concentration  $c_s$  pour laquelle le gain entropique est exactement égal à la perte  $\Delta \mu$ .

#### Deuxième remarque importante

Il faut garder à l'esprit le fait que l'équilibre entre phases solide et en solution est un équilibre dynamique, avec en permanence des molécules qui passent en solution et d'autres qui précipitent. A l'équilibre le bilan des flux correspondants à ces deux processus est nul car ils se compensent. La cinétique avec laquelle ces processus se déroulent n'est absolument pas décrite par les équations ci-dessus et peut faire intervenir une barrière énergétique  $\Delta \mu^*$  sans rapport direct avec le  $\Delta \mu$  précédemment décrit. Audelà de la dynamique à l'équilibre, les cinétiques de précipitation et de dissolution sont parfois complexes à décrire.

### 3.2.2 Cas des Ions

Le cas des ions a ceci de spécifique qu'il correspond à la libération au sein de l'eau d'espèces chargées. Ceci induit une composante supplémentaire au  $\Delta \mu$  lié au fait que chaque ion génère un champ électrique autour de lui. Si on considère l'ion comme une petite sphère de rayon *a* portant une charge q = ze (où typiquement z = 1, 2), l'énergie électrostatique correspondante est environ  $E_{ion} \simeq q^2/4\pi\epsilon a$ , où  $\epsilon$  est la constante diélectrique du milieu. D'après l'équation (3.2), cette énergie (self-énergie de l'ion) affecte le produit de solubilité  $c_s$  à travers le facteur  $E_{ion}/k_BT$  qui intervient dans une exponentielle. Ce rapport peut être réécrit

$$E_{ion}/k_BT \simeq z^2 l_B/a \tag{3.3}$$

où intervient naturellement une longueur  $l_B$ , dite "longueur de Bjerrum", qui compare effets entropiques et électrostatiques :

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon k_B T} \tag{3.4}$$

Cette longueur correspond à la distance au delà de laquelle l'énergie d'interaction de deux charges élémentaires devient inférieure à l'agitation thermique  $k_B T$ . Elle vaut environ  $l_B = 7$  Angström dans l'eau dans les conditions standard de température et pression ( $\epsilon = 80 \epsilon_0$ ).

L'estimation schématique ci-dessus conduit à plusieurs conclusions importantes :

- 1. Pour un petit ion monovalent (taille de l'ordre de l'Angström), le coût électrostatique de la dissolution sous forme chargée n'est que de quelques  $k_BT$ , et ne restreint donc pas trop dramatiquement le produit de solubilité. Les espèces chargées peuvent ainsi se dissoudre dans l'eau.
- 2. Pour des ions multivalents le coût électrostatique de la dissolution est notablement plus grand, alors que le gain d'entropie de translation est inchangé. En conséquence, les ions multivalents ont moins de facilité à se dissoudre seuls, et plus tendance à se complexer avec d'autres espèces de charges opposées, perdant ainsi de l'entropie, mais diminuant l'énergie électrostatique du complexe. Ceci est essentiel pour l'action biologique d'ions comme Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> par exemple.
- 3. L'eau a, entre autres du fait de la polarité de ses molécules, une constante diélectrique très grande par rapport à nombre de liquides : sa constante diélectrique est 80 fois celle du vide contre 3 ou 4 pour nombre de liquides organiques. La longueur de Bjerrum dans ces derniers peut être 20 ou 30 fois ce qu'elle est dans l'eau, et donc l'énergie de dissolution devient prohibitive et les produits de solubilité infimes. Une conséquence importante est que les ions sont quasiment absent de l'intérieur des membranes lipidiques, qui est un liquide organique de chaînes hydrocarbonnées. Celles-ci, malgré leur finesse (quelques nanomètres) sont donc d'efficaces barrières capables de compartimenter l'espace. Les ions ne peuvent les traverser que par des pores (passifs) ou des pompes (actives). Ceci permet de maintenir des différences de concentration appréciables entre intérieur et extérieur d'une telle membrane. Elles jouent un rôle primordial dans la propagation de l'influx nerveux par exemple.
- 4. Les conclusions énoncées pour les espèces chargées (ions) tendent aussi à s'appliquer aux molécules polaires qui se dissolvent plus facilement dans l'eau que dans un liquide de constante diélectrique plus faible.

### 3.2.3 Liaisons Hydrogène et effet hydrophobe

Ces liaisons, typiquement entre un atome H appauvri en électron par une liaison covalente et un atome riche en électrons (O ou N), sont primordiales pour comprendre le comportement de l'eau. Leur existence explique la haute température d'ébullition de l'eau (sans elles l'eau serait gazeuse dans les conditions ambiantes). Elles sont très directionnelles, c'est à dire que leur ampleur est très sensible à l'orientation de la liaison O–H par rapport aux liaisons covalentes dans lesquelles ces atomes sont par ailleurs impliqués. Ceci conduit l'eau solide à être un réseau pyramidal de faible densité, moins dense en fait que le liquide qui apparaît à 0 degrés (fait peu commun pour un élément, qui fait que la glace fond sous la pression d'un patin, où que les lacs gèlent d'abord en surface ce qui permet à la vie de continuer en dessous). A l'état liquide, ce réseau est notablement affecté par une dose sensible de désordre orientationnel et positionnel (l'entropie augmente), mais un bon nombre de liaisons H persiste.

Dissoudre une espèce dans l'eau amène à distordre localement cet arrangement, souvent avec un coût élevé, ce qu'on nomme parfois l'effet hydrophobe pour des molécules organiques (rappel : danger de cette terminologie évoqué ci-desssus). Se dissolvent plus facilement des espèces possédant elles-même des groupes susceptibles de former des liaisons H avec l'eau. Ceci a également une grande importance sur la conformation des protéines en solution : elles exposent préférentiellement vers l'extérieur leurs groupes capables de faire des liaisons H, ainsi que leur groupes chargés, alors qu'elles ont tendance à garder en leur sein les groupes qui conduiraient à un coût hydrophobe important s'ils étaient au contact avec l'eau. Cette hydrophobie est un des moteurs majeurs du repliement des protéines (avec la formation de structures comme les hélices alpha et les feuillets beta).

On peut citer une caractéristique assez remarquable de cet effet hydrophobe : la solubilité de beaucoup de molécules organiques simples tend à diminuer avec la température ! Ceci est en contraste avec l'image simple suivant laquelle à haute température la solubilité augmente parce que dans le combat entre le coût  $\Delta \mu$  et l'entropie translationnelle, c'est cette dernière que la température favorise. La seule façon d'expliquer une solubilité croissante est que ce coût augmente avec la température. En fait lors de la dissolution d'une espèce organique, l'eau forme une "cage" de liaisons hydrogène autour de l'intrus, augmentant en fait le nombre de liaisons par molécule d'eau au détriment du désordre entropique des liaisons H dans l'eau. Au bilan,  $\Delta \mu \sim \Delta h - T\Delta s$  avec  $\Delta h < 0$  (on gagne de l'énergie à la dissolution) mais  $\Delta s < 0$  (perte d'entropie de l'eau). Et c'est ce dernier effet qui pénalise la solubilisation à haute température.

### 3.2.4 Pression osmotique

Considérons une paroi qui sépare deux zones aqueuses contenant des espèces en solution, et que cette membrane ne laisse passer que certaines de ces espèces (on a vu que c'était le cas pour les membranes lipidiques présentes à l'extérieur et dans la cellule). Alors, des processus de transport se mettent en oeuvre pour équilibrer autant que possible les deux côtés de la paroi. Essentiellement, il s'agit d'augmenter l'entropie totale (diminuer l'énergie libre) autant que le permettent les contraintes. En particulier, si la membrane est perméable à l'eau, un écoulement aqueux dit osmotique va être généré.

Considérons un cas simple : une vésicule dans l'eau, avec une seule espèce ionique présente initialement à la concentration  $c_0$  à l'intérieur et  $c_{ext} < c_0$  à l'extérieur. La membrane vésiculaire est supposée perméable à l'eau mais pas aux ions. D'un point de vue thermodynamique, s'il on veut augmenter le nombre de configurations possibles du système (entropie translationnelle), il vaut mieux gonfler la vésicule pour offrir aux nombreux ions de l'intérieur plus de positions. En faisant exactement le même comptage des configurations que pour un gaz parfait dans le vide, cette tendance qualitative peut être exprimée par une "pression osmotique" qui vaut  $\pi = c_0 k_B T$  à l'intérieur et  $\pi = c_{ext} k_B T$  à l'extérieur. Il y a donc une différence de "pression" entre l'intérieur et l'extérieur qui tend à pousser le fluide à perméer à travers la membrane. La vésicule va gonfler jusqu'à ce que l'élasticité de la membrane compense la chute de pression osmotique.

Dans nombre de situations, les cellules sont ainsi en permanence sous contrainte mécanique, du fait d'une différence de pression osmotique avec l'extérieur, même si la bicouche qui englobe la cellule n'est souvent que faiblement perméable à l'eau. Cet effet, purement entropique, peut être vu comme l'effet de l'interaction des ions et molécules avec la paroi. Il permet une régulation du volume de la cellule par activation des canaux ou pompes qui modifient les concentrations de part et d'autre de la membrane. Ordre de grandeur : pour une chute de concentrations ioniques de  $10^{-1}M$ , on obtient une différence de pression osmotique de 2.5 atmosphères (!), capable de faire éclater des cellules (technique de "choc osmotique" utilisée en biotechnologie). Dans un autre contexte ce mécanisme aide la sève à grimper au sommet de grands arbres où l'évaporation de l'eau rend les concentrations en solutés plus fortes.

### 3.3 De plus gros objets

En plus d'ions et de petites molécules, de plus gros objets flottent dans le cytoplasme, souvent constitués par assemblage ou agrégation spécifique de plus petites unités.

Pour décrire l'interaction en solution d'objets de tailles allant de quelques nanomètres à quelques microns, le point de référence habituel est la théorie développée pour les colloïdes (objets de tailles microniques et submicroniques) au milieu du XXème siècle . Nous en reprenons quelques éléments en considérant pour schématiser des sphères de rayon R.

### 3.3.1 Le problème : attraction "universelle" à longue portée

Premier problème : libérer en solution un objet gros ne rapporte qu'une entropie de translation comparable à celle de la solvatation une petite molécule. Par contre, le gain enthalpique à le recoller à un ou plusieurs de ses semblables va être beaucoup plus grand que pour une petite molécule (beaucoup de liaisons à petite échelle)! Donc il est a priori difficile de dissoudre des gros objets en solution ou de les empêcher de se coller (gros coût de surface).

Deuxième problème : en fait la situation est encore plus difficile que ne le suggère le point ci-dessus car les objets non seulement "collent" lorsqu'au contact, mais s'attirent à distance. C'est le résultat des "forces de dispersion" ou "forces de van der Waals". Sans rentrer dans un détail inutile ici, du fait des fluctuations quantiques et thermiques de la polarisation, deux sphères d'un même matériau plongé dans un solvant s'attirent à longue distance, avec un potentiel d'interaction V(d) qui dépend de la distance dentre les sphères de la façon schématique suivante :

- sphères éloignées : si  $R \ll d$  alors  $V(h) \sim -HR^6/d^6$ 

- sphères proches : si  $R \gg d$  alors  $V(h) \sim -HR/d$ 

où H est la constante d'Hamaker qui dépend des natures respectives du solvant et des sphères (contraste de constante diélectrique en particulier). Elle est homogène à une énergie, et souvent d'ordre plusieurs  $k_BT$ .



FIG. 3.2 – Situation modèle : du fait des attractions de van der Waals, deux sphères de même nature plongées au sein d'un solvent s'attirent par des forces à longue portée.

Ceci suggère par exemple que dès que des objets de  $R \sim 50nm$  s'approchent l'un de l'autre à des distances d de quelques nm ils sont attirés et piégés l'un contre l'autre par des énergies excédant largement  $k_BT$ . Ce phénomène répété conduit à une agrégation quasi-définitive puis à la précipitation des objets!

### 3.3.2 Interactions électrostatiques : écrantage

Pour lutter contre cet effet, il faut introduire des répulsions entre objets. Une voie est d'utiliser des objets chargés de même signe. Toutefois la situation est très différente de l'électrostatique entre objets dans le vide (Figure 3.3.2). En effet la solution ou le cytosol contiennent de nombreux petits ions qui réagissent à la présence d'objets chargés plus gros. Essentiellement leur réaction est guidée par une compétition entre entropie et énergie électrostatique.



FIG. 3.3 – Gauche : image naȚve (électrostatique dans le vide). Droite : structure en solution. Une charge nette apparaît dans la solution au voisinage de la surface chargée, de sorte que l'ensemble est neutre. Le champ électrique généré par les charges est ainsi "écranté".

Supposons que l'on introduise un gros objet uniformément chargé positivement dans une solution ionique. Pour réduire le champ qu'il crée et l'énergie électrostatique correspondante, la solution réagit en rapprochant de l'objet des ions de charge opposée (les contre-ions, ici négatifs) et en éloignant des ions de même charge (co-ions). Cette contrainte conduit à un confinement relatif de certains ions, donc à moins de configurations possibles, donc à une diminution de l'entropie translationnelle. Les effets de cette dernière, mesurés par  $k_BT$  vont donc être de limiter cet effet. Une vision plus microscopique de la situation est qu'un contre-ion (négatif) est attiré par la surface mais ballotté par l'agitation thermique qui lui interdit de venir d'y localiser.

La structure résultante est la suivante : la compétition électrostatique/entropie fait apparaître une longueur  $\lambda_D$  souvent appelée longueur de Debye. Les concentrations ioniques ne sont modifiées que dans une couche de quelques  $\lambda_D$  d'épaisseur autour de la surface de l'objet de façon à compenser exactement la charge qu'il porte. A des distances plus grandes de la surface, la solution redevient neutre, et le champ électrique est nul du fait de la compensation des charges dans le voisinage de la surface. On constate donc qu'à longue distance, le champ créé par l'objet est "écranté", et donc qu'un autre objet chargé ne le verra pas !

Il n'y aura donc interaction due à la charge qu'à des distances comparables à  $\lambda_D$ . Cette longueur, pour une solution contenant des espèces i de charge  $z_i e$  en concentration  $c_i$  vaut :

$$\lambda_D = \left[\frac{\epsilon k_B T}{e^2 (\Sigma_i z_i^2 c_i)}\right]^{1/2} \tag{3.5}$$

où  $\epsilon = \epsilon_r \epsilon_0$  est la constante diélectrique de la solution. De façon logique  $\lambda_D$  croît avec la température (les effets entropiques sont favorisés à haute température). Elle décroît avec la salinité du milieu comme la racine carrée de celle-ci. Pour une solution d'électrolyte 1 :1 simple (un seul type d'ions positifs et un seul type d'ions négatifs, tous deux de valence 1, comme NaCl ou KCl par exemple), à la concentration  $c_0$  on peut écrire  $\lambda_D = (8\pi l_B c_0)^{-1/2}$  en faisant intervenir la longueur de Bjerrum précédemment définie. Pour l'eau à température ambiante,  $l_B \simeq 7$  A, ce qui donne  $\lambda_D \simeq 1$  nm pour  $c_0 = 10^{-1}M$  et  $\lambda_D \simeq 10$  nm pour  $c_0 = 10^{-3}M$ .

Une conclusion importante est que si l'on désire éviter l'agrégation des objets, il faut non seulement une charge importante en surface, mais également une salinité pas trop grande. En effet, à trop fortes salinités, les répulsions électrostatiques sont écrantées sur de très faibles distances, et ne peuvent donc lutter contre les effets à longue portée des interactions attractives mentionnées avant. C'est par exemple ainsi que les sédiments des fleuves précipitent au niveau des estuaires où ils sont mis en contact avec de l'eau salée.



FIG. 3.4 – Description schématique de l'énergie d'interaction en fonction de la distance entre deux sphères (courbe continue), comme somme de l'attraction de van der Waals (tirets longs) et de la répulsion électrostatique exponentiellement écrantée sur une distance  $\lambda_D$  (tirets courts).

Si la densité de charge de surface est assez forte et la salinité assez faible, la répulsion électrostatique, qui est toujours plus faible que les attractions à très grandes et très faibles distances, peut néanmoins les contrebalancer à des distances intermédiaires (de l'ordre de la longueur d'écran  $\lambda_D$ ). Ceci conduit à la formation d'un minimum d'énergie, dit secondaire (le minimum primaire correspond au contact des molécules), comme sur la figure 3.3.2.

Pour des objets biologiques de même signe de charge de surface, la répulsion électrostatique va se manifester à des distances entre objets d de l'ordre de  $\lambda_D$  soit quelques nanomètres. Suivant les cas, suivant la taille et le détail des distributions de charge et interactions à courte portée, on peut avoir des situations avec un minimum secondaire de quelques  $k_B T$  qui permet aux objets de "coulisser" l'un par rapport à l'autre en restant à quelques nm de distance, voire de se séparer. Ceci peut permettre par exemple des mécanismes de reconnaissance spécifiques entre sites particuliers par diffusion des objets au voisinage l'un de l'autre. Dans d'autres cas la charge n'est pas assez forte pour assurer répulsion et les objets s'aggrègent en l'absence d'autres phénomènes.

### 3.3.3 Raffinements entropiques

Dans le monde industriel où les objets sont parfois plus gros (microns plutôt que nanomètres), il existe deux stratégies pour affiner le contrôle des interactions, basées sur deux effets essentiellement entropiques, et qui consistent en l'utilisation d'objets additionnels plus petits que les particules de départ. De façon remarquable, ces deux stratégies, dont l'une favorise l'agrégation alors que l'autre a pour but de la prévenir en créant des répulsions, se retrouvent dans le monde cellulaire.



FIG. 3.5 – Gauche : chevelure de polymère gonflée par l'agitation thermique. Droite : une variante "militaire" avec une chevelure courte et drue.

### Protection stérique (répulsion supplémentaire) :

Pour empêcher les particules de se rapprocher à des distances où les attractions de van der Waals seraient trop fortes, une idée raisonnable est d'entourer les particules par une couronne qui empêche stériquement le contact en limitant par le bas les valeurs de d accessibles. Le problème est de faire cette couronne en un matériau semblable au solvant, sinon on induit une attraction couronne/couronne de type van der Waals et le problème se trouve simplement déplacé à la surface des couronnes...

Une solution est de fixer des polymères sur la surface comme une chevelure (brosse pour les polyméristes). Les "cheveux" sont flexibles et "ont envie" (entropiquement) de pouvoir adopter nombre de configurations, ils se repoussent ainsi les uns les autres ce qui gonfle la chevelure, dont le volume se trouve essentiellement constituée de solvant. Par le même mécanisme ils refusent d'être confinés par la présence de la chevelure d'en face, ce qui induit une répulsion à courte portée entre les chevelures et donc les particules qui les portent. Ceci permet de maintenir les particules à distance...

Dans le monde cellulaire les membranes et plusieurs autres objets sont couverts de polymères, qui forment ainsi une chevelure ou un coussin (peu dense) qui permet d'éviter des contacts directs dangereux. Ceci est valable également pour la membrane externe des cellules.



FIG. 3.6 – Gauche : les petites particules (non-adsorbantes) sont exclues de la proximité des deux grosses particules (zones en clair). Droite : Si les grosses particules se rapprochent suffisamment, ces zones interdites se recouvrent, ce qui laisse plus de volume disponible pour les petites particules. Ceci induit une attraction effective entre grosses particules, d'origine entropique, dite attraction de déplétion.

#### Interactions de déplétion (attraction supplémentaire) :

Si au contraire on veut induire une attraction supplémentaire, une solution est d'ajouter des objets plus petits (mais plus grands que les molécules du solvant) "non collants". Considérons la situation modèle suivante : deux grandes sphères de rayon R dans une suspension de petites sphères de rayon r en concentration diluée c, avec répulsion stérique entre toutes les sphères. Il existe autour de chaque grande sphère une zone d'épaisseur r dont sont exclues les centres de masse des petites, ce qui représente une perte d'entropie translationnelle pour ces petites sphères. Si l'on approche les deux grandes sphères à moins de 2r l'une de l'autre, ces "zones interdites" se chevauchent, et leur volume total diminue, donc l'entropie des petites sphères augmente. On a ainsi généré une attraction à courte portée. Cet effet peut être vu comme le résultat de la pression osmotique (ordre  $k_BTc$ ) qui tend à aspirer le solvant hors de la zone interdite, et à appuyer les sphères l'une contre l'autre. Le même phénomène a tendance à attirer les grosses particules vers les parois du système et les maintenir à des distances d'ordre r de celles-ci.

Ce mécanisme entropique non-spécifique dit "de déplétion" a pour conséquence d'accélérer significativement certains mécanismes de croissance d'agrégats de protéines (microtubules par exemple) lorsque d'autres espèces sont nombreuses en solution.

### **3.4** Conclusions du chapitre

Les effets entropiques sont omniprésents dans l'organisation de la cellule, et sont déterminants pour la physico-chimie des solutions aqueuses.

Dans l'eau les objets chargés ne se voient électrostatiquement qu'à courtes distances (quelques nanomètres). Les zones chargées préfèrent rester dans un environnement aqueux que dans une environnement organique (membrane, intérieur de protéines repliées). Les liaisons hydrogène et les effets "hydrophobes" associés sont des moteurs forts pour l'organisation à petite échelle (repliement des protéines, formation des complexes).

Le fait que la cellule soit suffisamment fluide pour assurer de multiples fonctions et que différents éléments puissent plus spécifiquement se retrouver pour assurer des taches particulières repose sur un équilibre délicat. Si des objets nanométriques ou plus grands se rencontrent, ils peuvent résister à l'agrégation si des répulsions électrostatiques ou stérique le permettent, jusqu'à ce que des reconnaissances spécifiques locales puissent s'exercer.

On a donc finalement une soupe avec de petits grumeaux dynamiques qui se forment et se défont suivant des interactions spécifiques. Il reste à rappeler qu'aux points discutés ici il faut ajouter tous les phénomènes liés au caractère intrinsèquement hors d'équilibre de la cellule ! Les mécanismes évoqués ici restent effectifs, mais leur mise en oeuvre et régulation peuvent être fortement affectées par les flux énergétiques et chimiques toujours présents. C'est ce que l'on verra par exemple au chapitre 8 où une chimie hors équilibre permet la génèse dynamique de filaments et de gels au sein de la cellule.

### Chapitre 4

## Diffusion thermique et mouvement Brownien

### 4.1 Idée physique

Un objet dans l'eau (une protéine, une nanoparticule, une molécule de colorant) est en interaction avec un milieu ambiant, le solvant, auquel l'agitation thermique confère une énergie cinétique "incohérente" en ce sens qu'elle excite tous les degrés de liberté indifféremment. La description de l'interaction de l'objet avec le solvent est en général très complexe.

On peut tirer une intuition d'une description simpliste où le solvant serait constitué de petites sphères avec des interactions à courte portée. Alors l'interaction se résume à des collisions, avec l'objet intrus bombardé de tous côtés par les molécules de solvant. Sous ce bombardement, l'objet acquiert lui même une énergie cinétique (il est "thermalisé" par le solvant), ce qui lui confère un mouvement erratique et désordonné à grande échelle. Une des premières observations de ce mouvement erratique est due à Brown au XIXéme siècle qui observa un tel mouvement pour des grains de pollen, d'où le nom de "mouvement Brownien" pour cette évolution erratique.

Avant d'aller plus loin une première remarque : la description simpliste ci-dessus suggère à qui a suivi un cours de physique statistique que l'objet acquiert par thermalisation une vitesse dont l'ordre de grandeur v suivrait une loi d'équipartition classique  $m_p v^2/2 = k_B T/2$  (suivant une direction), où  $m_p$  est la masse de l'objet. Pour un objet de taille micronique, celle-ci est d'ordre volume x densité, soit en gros  $(10^{-6})^3 \text{ m}^3 \text{ x } 10^3 \text{ kg/m}^3$ , d'où  $m_p \sim 10^{-15} \text{ kg}$ . Avec  $k_B T = 4 \ 10^{-21} J$ , celà conduit à  $v \sim 2 \ mm/s$ , beaucoup plus rapide que ce qu'a observé Brown (des déplacements à quelques microns/s)! Comment résoudre cette différence notable? Une première voie consiste à envisager que la particule déplace avec elle le liquide qui l'environne, et qu'il faut peut-être remplacer  $m_p$  par une masse effective. Mais pour correspondre aux observations de Brown, celle-ci devrait être  $10^6$  fois celle de la particule (un volume de liquide de dimension cent fois la taille de la particule)! De fait, nous allons voir que si l'hydrodynamique est effectivement impliquée, c'est la caractérisation même de ce mouvement en terme de vitesse typique qui est incorrecte.

### 4.2 Modèle idéalisé

Pour aborder de façon simple les ingrédients à la base du mouvement Brownien, nous commençons par un modèle schématique assez réducteur. Suivons l'évolution dans le temps d'une particule de masse  $m_p$  qui progresse selon les règles suivantes :

- la particule évolue à une dimension sur un axe Ox.

- tous les  $\tau$ , elle subit une collision, dont elle ressort avec une vitesse qui est soit  $v_0$  (probabilité 1/2) soit  $-v_0$  (probabilité 1/2). Elle perd donc toute mémoire du sens de la vitesse qu'elle avait avant la collision.

- entre les collisions elle a un mouvement libre (ballistique) à vitesse constante.

Cette règle du jeu très simple correspond à l'évidence à "une marche au hasard", la particule faisant une succession de pas de longueur exactement  $v_0\tau$ , chaque pas étant tiré au hasard vers la droite ou la gauche, *indépendemment* des tirages précédents ou suivants.

De la discussion de l'introduction, on s'attend à ce que la vitesse instantanée typique de la particule  $v_0$  soit donnée par  $m_p v_0^2/2 \simeq k_B T/2$ .

### 4.2.1 Mouvement Brownien seul

La vitesse de la particule entre  $i\tau$  et  $(i+1)\tau$  est une variable aléatoire notée  $v_i$ , à laquelle correspond de façon directe une autre variable aléatoire  $\delta x_i = v_i \tau$ , qui est la distance parcourue pendant cet intervalle de temps. Les variables  $v_i$  ont pour moyenne et pour covariance :

$$\langle v_i \rangle = 0 \; ; \; \langle v_i v_j \rangle - \langle v_i \rangle \langle v_j \rangle = \langle v_i v_j \rangle = v_0^2 \; \delta_{ij} \tag{4.1}$$

La deuxième équation étant la conséquence de l'indépendance des variables.

Si l'on note x(t) la position de la particule à l'instant t, alors pour  $t = N\tau$ ,  $x(t) = x(0) + \sum_{0}^{N-1} \delta x_i$ , d'où pour la variable aléatoire *distance totale parcourue*, en prenant la moyenne sur les tirages possibles aux différents instants, une moyenne

$$\langle x(t) - x(0) \rangle = \sum \langle \delta x_i \rangle = 0$$
 (4.2)

ce qui était évident par symétrie (ou parité), et une variance

$$\left\langle (x(t) - x(0))^2 \right\rangle = \sum_{i,j} \left\langle \delta x_i \delta x_j \right\rangle = \sum_{i,j} \left\langle \delta x_i^2 \right\rangle + \sum_{i \neq j} \left\langle \delta x_i \delta x_j \right\rangle = N v_0^2 \tau^2 = (v_0^2 \tau) t \tag{4.3}$$

ce qui conduit à une loi dite de diffusion où la distance typique parcourue, mesurée par l'écart type, progresse comme la racine carrée du temps. Il est classique d'utiliser le **coefficient de diffusion** D pour la caractériser, qui est défini pour un mouvement Brownien à une dimension par :

$$\left\langle (x(t) - x(0))^2 \right\rangle = 2Dt \tag{4.4}$$

Dans notre petit modèle, on a simplement :

$$D = \frac{1}{2}v_0^2\tau\tag{4.5}$$

Plusieurs remarques importantes suivent immédiatement :

- Le fait d'obtenir une loi de type diffusif est (pour très une large part) indépendant de notre choix de modèle. On voit ci-dessus qu'il est directement lié au fait que les variances des pas sont additives. Ceci est vrai si ces variances existent (ne sont pas infinies), et si les pas sont décorrélés. Le cadre mathématique de ce résultat de théorie des probabilités est le Théorème de la Limite Centrale, ou la loi des grands nombres. Celles-ci stipulent qu'en plus du comportement en racine carrée de N (ou de t), la distribution de la somme tend asymptotiquement vers une Gaussienne, totalement caractérisée par sa moyenne (0 dans l'exemple ci-dessus) et par sa variance (donc par D ici).

- Par exemple, en élargissant le modèle ci-dessus à un tirage au sort de la vitesse après chaque collision plus complexe que le simple  $\pm v_0$ , on trouve immédiatement  $D = \frac{1}{2}var(v)\tau$ , où var(v) est la variance de la vitesse aléatoire après une collision.

- La conséquence physique importante est que si on regarde le mouvement à une échelle de temps beaucoup plus grande que  $\tau$ , toute l'information microscopique sur la dynamique est condensée dans le seul nombre D. De fait, des dynamiques microscopiques très différentes peuvent conduire à la même valeur de D et être de ce fait indifférentiables à temps longs.

- Clairement, un tel mouvement ne peut être caractérisé par une "vitesse" typique.

- en dimension d, on obtient une variance croissant comme  $\langle \vec{r}^2(t) \rangle = d.(2Dt)$ , avec par exemple  $\langle \vec{r}^2(t) \rangle = \langle x^2(t) \rangle + \langle y^2(t) \rangle + \langle z^2(t) \rangle = 6Dt$  à trois dimensions.

### 4.2.2 En présence d'une force extérieure

Si une force extérieure F est appliquée sur la particule dans le petit modèle de cette section, alors, par intégration de l'équation de Newton, sa progression pendant l'intervalle  $[i\tau, (i+1)\tau]$  est donnée par la variable aléatoire :

$$\delta x_i = v_i \tau + \frac{F \tau^2}{2m_p} \tag{4.6}$$

En reprenant alors les calculs du paragraphe précédant, on trouve que la position x de la particule a évolué pendant le temps t, d'une distance (aléatoire)  $\Delta x(t) = x(t) - x(0)$  de moyenne

$$\langle \Delta x(t) \rangle = \frac{F\tau}{2m_p} t \tag{4.7}$$

et de variance

$$\left\langle \Delta x^2(t) \right\rangle - \left\langle \Delta x(t) \right\rangle^2 = \left\langle \left( \Delta x(t) - \frac{F\tau}{2m_p} t \right)^2 \right\rangle = 2Dt$$
 (4.8)

La différence avec la situation sans force est que la particule progresse maintenant avec une vitesse moyenne non nulle  $\langle v \rangle = \frac{\tau}{2m_p} F$ .

Le mouvement de la particule est maintenant une combinaison de diffusion Brownienne et de dérive dans la direction de F. A temps t longs devant  $\tau$  mais courts devant  $4Dm_p^2/F^2\tau^2 = D/\langle v \rangle^2$ , l'effet de la force est négligeable et on a  $\langle \Delta x^2(t) \rangle \simeq 2Dt$  et donc un mouvement dominé par la diffusion, alors qu'à temps plus longs  $t \gg D/\langle v \rangle^2$  on obtient essentiellement un mouvement dirigé à vitesse constante,  $\Delta x \simeq \langle v \rangle t$  avec des petites corrections relatives d'ordre  $(D/\langle v \rangle^2 t)^{1/2}$ .

Coefficient de friction : Cette vitesse moyenne est proportionnelle à la force appliquée. Même si les ingrédients de notre petit modèle sont simplistes, ce type de relation est observée pour le mouvement de petites particules dans des fluides visqueux. Elle est souvent décrite comme un équilibre moyenné entre les forces extérieures F exercées sur la particules et les forces de frictions correspondant à la résistance du milieu à son mouvement  $-\gamma \langle v \rangle$ , où  $\gamma$  est le coefficient de friction de l'objet dans le milieu :

$$F - \gamma \left\langle v \right\rangle = 0 \tag{4.9}$$

Dans notre petit modèle cette friction vient de l'effaçage du mouvement cohérent induit par F à chaque collision. l'énergie thermique acquise par la particule est transmise au milieu sous forme d'énergie cinétique incohérente, c'est à dire de chaleur.

Echanges thermiques : la dernière remarque suggère que  $\gamma$  caractérise l'efficacité du transfert énergétique de la particule vers le milieu : une particule avec beaucoup d'énergie cinétique en cède au milieu par friction (en ralentissant). Or on a décrit le phénomène de diffusion comme étant le résultat du transfert d'agitation thermique du milieu (énergie cinétique) vers la particule. On s'attend donc à ce que D soit relié à  $\gamma$ , étant tous deux caractéristiques des échanges d'énergie entre la particule et le solvant.

Suivons un instant cette piste, avec notre petit modèle. On a vu  $D = v_0^2 \tau/2$ . L'équipartition de l'énergie amène  $mv_0^2/2 = k_B T/2$ , et le modèle produit la relation simple  $\gamma = 2m_p/\tau$ . On a donc une relation très simple, dont la validité va bien au delà de ce modèle :

C'est la relation d'EINSTEIN (1905) qui relie de façon simple et universelle ces deux coefficients :

$$D = \frac{k_B T}{\gamma} \tag{4.10}$$

Cette équation amène nombre de commentaires :

- C'est une forme particulière de relations dites de "fluctuation/dissipation" qui expriment qu'une mesure de l'amplitude des fluctuations spontanées d'une quantité (ici les fluctuations de position mesurées par D), est proportionnelle à  $k_B T$  (le moteur des fluctuations) multiplié par le coefficient de réponse -en régime linéaire- de cette variable à un champ extérieur (ici le champ est la force et le coefficient de réponse  $1/\gamma$ ). Très schématiquement, la physique qualitative est que si un système est "mou" (grand coefficient de réponse), alors ses fluctuations spontanées sous l'effet de  $k_B T$  seront grandes. - Cette relation permet d'estimer ou calculer simplement le coefficient de diffusion d'une particule dans un fluide visqueux (de viscosité  $\eta$ ). Nous avons vu que la friction sur une sphère de rayon R conduit à  $\gamma = 6\pi\eta R$ , ce qui conduit à  $D = k_B T/6\pi\eta R$ . Bien sûr la plupart des particules ne sont pas des sphères, mais nous avons vu que cette formule produit une bonne estimation de  $\gamma$  et donc de D en prenant pour R la moitié de la plus grande dimension de la particule.

- Une remarque historique : pourquoi Einstein s'intéressait-il au mouvement Brownien l'année où il a découvert la relativité restreinte et l'effet photoélectrique (démontrant la nature particulaire de la lumière)? En fait la formule ci-dessus permet de déterminer  $k_BT$  si on mesure indépendamment D et  $\gamma$ . Et la théorie statistique des gaz de la fin du XIXéme siècle permettait de déterminer  $Nk_BT$  pour une quantité de gaz donnée, mais pas N et  $k_BT$  séparément. Pour accéder au nombres de "molécules" (ou objets individuels présents), il fallait accéder à N ce qui devient possible si on connaît  $k_BT$ . La relation ci-dessus permet donc indirectement d'estimer la taille des grains de matière (molécules), comme l'effet photoélectrique permettait de mesurer l'énergie des grains de lumière.

### 4.2.3 Ordres de grandeur

Examinons les ordres de grandeur résultant de la relation d'Einstein et la formule de Stokes, qui donnent  $D = k_B T/6\pi\eta R$ , pour le cas où le liquide est de l'eau ( $\eta \sim 10^{-3} Pa.s$  dans les conditions ambiantes) :

Une molécule de  $R \sim 1A$  a un coefficient de diffusion  $D \sim 2 \ 10^{-9} m^2/s = 2 \ \mu m^2/ms$ . Une protéine de  $R \sim 10 \ nm$  a un coefficient de diffusion  $D \sim 2 \ 10^{-11} m^2/s = 20 \ \mu m^2/s$ . Une bille de  $R \sim 1 \ \mu m$  a un coefficient de diffusion  $D \sim 2 \ 10^{-13} m^2/s = 0.2 \ \mu m^2/s$ . Une bille de  $R \sim 1 \ mm$  a un coefficient de diffusion  $D \sim 2 \ 10^{-16} m^2/s = 210^{-10} \ mm^2/s$ .

En rappelant que le mouvement diffusif Brownien correspond à des déplacements  $\langle \Delta x(t) \rangle \sim (2Dt)^{1/2}$ , on voit que la diffusion est négligeable à échelle expérimentales classiques pour des objets millimétriques, et que l'échelle micronique est parfaite pour son observation directe à l'échelle de plusieurs minutes (Brown).

On peut également utiliser le petit modèle pour éclairer un point mentionné dans l'introduction. Prenons une molécule ou un atome de masse 20 nucléons (par exemple). Alors les vitesses thermiques  $v_0$  correspondantes sont de plusieurs centaines de mètres par seconde alors que le coefficient de diffusion fait ressortir des échelles de temps plus lentes  $D \sim (40 \mu m)^2/s$ . C'est le paradoxe mentionné en introduction, dont la "solution" est liée au fait que le temps entre "collisions"  $\tau$  est trés court (le petit modèle vous donne ici  $\tau$  d'ordre  $10^{-14}s$ ). Donc à des échelles de temps très courtes le mouvement est très rapide, mais ce qu'on observe macroscopiquement (à des échelles spatiales et temporelles beaucoup plus grande) est le résultat d'une forme de moyennage du très grand nombre ( $\sim t/\tau$ ) de vols très courts et très brefs effectués par la particule dans des directions aléatoires. plus précisément on observe l'écart au moyennage idéal dû au nombre fini de collisions.

### 4.2.4 Description de Langevin

Pour décrire quantitativement le mouvement aléatoire d'une particule sous l'effet combiné d'une force extérieure et de l'agitation thermique, une stratégie est l'équation de Langevin, qui consiste a décrire les effets de l'agitation thermique par une force aléatoire  $\theta(t)$ . On a alors pour une particule soumise à une force extérieure F le bilan des forces (à une dimension) :

$$m_p \frac{dv}{dt} = -\gamma v + F + \theta(t) \tag{4.11}$$

où v = dx/dt est la vitesse de la particule et où  $\theta$  doit être choisi de façon à rendre compte de la diffusion thermique. Si on étudie le mouvement à des échelles de temps grandes devant  $\tau$ , la seule caractéristique du mouvement Brownien observable est le coefficient de diffusion  $D = k_B T/\gamma$ . On utilise alors pour les  $\theta(t)$  des variable Gaussiennes, totalement décrites par moyennes et covariances :

$$\langle \theta(t) \rangle = 0 \; ; \; \langle \theta(t)\theta(t') \rangle = 2 \gamma k_B T \,\delta(t-t')$$

$$\tag{4.12}$$

La première de ces équations explicite le fait que le mouvement Brownien n'est pas biaisé. La seconde indique que l'amplitude des forces aléatoires est contrôlée par  $k_B T$  et  $\gamma$  où D, et que les forces aléatoires à des instants différents sont décorrélées. Le préfacteur 2 permet de vérifier la relation d'Einstein.

Il est classique dans cette limite de négliger les termes inertiels (beaucoup plus petits que les effets de friction à des échelles de temps beaucoup plus grandes que  $\tau$ ). Il est alors facile de montrer que pour une particule en l'absence de force extérieure, la distribution de probabilité pour son déplacement en un temps t est une Gaussienne dont la largeur (l'écart type) croît bien comme  $(2Dt)^{1/2}$ , et donc que l'équation (4.11) reproduit bien la diffusion libre.

L'avantage de ce formalisme est qu'il permet de décrire l'évolution Brownienne d'une particule dans un environnement donné, souvent représenté par un potentiel extérieur W(x). Dans ce cas la force  $F = -\nabla W$ dépend de la position. Si les solutions analytiques sont rares, l'équation (4.11) se prête bien à la simulation numérique.

### 4.3 Description macroscopique

Jusque là nous nous sommes intéressés au mouvement aléatoire d'une seule particule dont nous suivions l'évolution. Dans nombre de situations, on s'intéresse plutôt à l'évolution d'une population de particules que l'on cherche à décrire à une échelle plus grande par une concentration  $c(\mathbf{r}, t)$ . C'est cette approche plus macroscopique (et antérieure) que nous allons chercher à introduire dans cette section, en indiquant à la fin le lien avec l'approche microscopique.

Indépendemment du modèle et des mécanismes de mouvement, en l'absence de création ou d'annihilation de particules (par exemple par des réactions chimiques), l'équation d'évolution prend nécessairement la forme d'une équation de conservation :

$$\partial c/\partial t + \nabla \mathbf{J} = 0 \tag{4.13}$$

où  $\mathbf{J}$  est le courant de particules, dont une forme de définition est que le flux de particules à travers un petit élément de surface orienté  $\mathbf{dS}$  est  $\mathbf{J}$ .  $\mathbf{dS}$ .

Pour le cas simple de particules simplement entraînées à une vitesse  $\mathbf{v}$ , par exemple par une force extérieure auquel cas  $\mathbf{v} = \mathbf{F}/\gamma$ , on a simplement :

$$\mathbf{J} = c\mathbf{v} = c\mathbf{F}/\gamma. \tag{4.14}$$

Nous avons vu qu'en présence de mouvement Brownien les particules ont des mouvements erratiques. En faisant l'approximation que les "collisions" subies par une particule soient indépendantes de celles subies par une autre, les mouvements erratiques des particules vont être décorrélés. Des particules initialement voisines vont stochastiquement s'éloigner. C'est ce qui conduit à l'élargissement d'une tache de colorant dans un liquide (en l'absence de convection). Essayons de décrire cet effet de diffusion en termes de courant de particules.

Pour celà, considérons de nouveau notre petit modèle simple à une dimension pour le mouvement Brownien seul (paragraphe 4.2.1). Essayons d'évaluer le nombre de particules qui vont traverser par exemple la surface x = 0 pendant la (très petite) durée d'un vol libre, soit  $\tau$ . Pour des  $\tau$  très petits, ce nombre est  $J(x = 0)\tau$ . Dans notre modèle, une particule garde pendant cette durée la même vitesse, qui est  $\pm v_0$  avec une probabilité 1/2. On voit donc simplement que la moitié des particules situées à gauche de x = 0 à une distance inférieure à  $v_0\tau$  vont traverser la surface de gauche à droite pendant cet intervalle de temps, et que la moitié des particules situées dans le volume symétrique à droite vont la traverser dans le sens opposé. Ceci conduit à :

$$J\tau = \frac{1}{2} \int_{-v_0\tau}^{0} dx \ c(x) - \frac{1}{2} \int_{0}^{v_0\tau} dx \ c(x)$$
(4.15)

Rappelons nous maintenant que l'on considère le mouvement à des échelles beaucoup plus grandes que celle des vols de durée  $\tau$ , et donc que  $v_0\tau$  est petit par rapport aux échelles spatiales de variation de c. En écrivant  $c(x,t) \simeq c(0,t) + \partial_x c(0,t) \cdot x + \dots$ , on obtient :

$$J(0,t) \simeq -\frac{1}{2} v_0^2 \tau \frac{\partial c}{\partial x}(0,t) = -D \frac{\partial c}{\partial x}(0,t)$$
(4.16)

où on a utilisé la définition de D dans la section  $2: 2D = v_0^2 \tau$ .

Plus généralement, et en particulier à 3 dimensions, le courant peut s'écrire lorsque les particules ont de plus une vitesse moyenne non nulle :

$$\mathbf{J} = c\mathbf{v} - D\nabla c \tag{4.17}$$

Associé à l'équation de conservation, ceci conduit pour le mouvement de particules sous l'effet combiné d'un champ de force  $\mathbf{F}(\mathbf{r})$  et de l'agitation thermique, à l'équation dite de Fokker-Planck,

$$\partial c / \partial t + \nabla \mathbf{J} = 0 \tag{4.18}$$

$$\mathbf{J} = c\mathbf{F}/\gamma - D\nabla c \tag{4.19}$$

Plusieurs remarques :

- si les particules n'interagissent pas entre elles (régime dilué), alors le champ de force ne dépend pas de c et le système est linéaire en c. Dans cette limite il n'y pas de distinction entre la description d'une population de particules décrite par c, et celle de l'évolution probabiliste d'une seule particule décrite par  $P(\mathbf{r},t)$  la densité spatiale de probabilité de présence de la particule. Dans cette limite l'équation obtenue en remplaçant c par P dans (4.18)(4.19) est exactement équivalente à l'équation de Langevin (4.11) vue précédemment, sans termes inertiels (c'est le terme  $-D\nabla P$  dans la description Fokker-Planck qui génère la même physique que la force aléatoire  $\theta(t)$  dans l'équation de Langevin).

- en l'absence de force, cette équation, se résume à l'équation de diffusion, ou loi de Fick

$$\partial c/\partial t = D\Delta c \tag{4.20}$$

Cette équation fait apparaître immédiatement la relation temps  $\langle - \rangle$  distance<sup>2</sup> caractéristique des phénomènes de diffusion (les phénomènes de propagation correspondent à temps  $\langle - \rangle$  distance). Pour des particules commençant à la même position, soit  $c(\mathbf{r}, t = 0) = c_0 \delta^d(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)$ , sa solution en dimension d est une Gaussienne :

$$c(\mathbf{r},t) = c_0 (2\pi\sigma^2)^{-d/2} exp(-\frac{(\mathbf{r}-\mathbf{r}_0)^2}{2\sigma^2})$$
(4.21)

$$\sigma^2 = 2Dt \tag{4.22}$$

- si la force appliquée aux particules dérive d'un potentiel  $W(\mathbf{r})$ , soit  $\mathbf{F} = -\nabla W$ , alors il est facile de voir qu'il y a une famille de solutions d'équilibre au système de Fokker-Planck (4.18)(4.19) correspondant à des courants nuls  $\mathbf{J} = -c\nabla W/\gamma - D\nabla c = \mathbf{0}$ . Ces solutions s'écrivent  $c_{eq} = c_0 \exp[-W/(\gamma D)]$  (où  $c_0$ est une constante de normalisation arbitraire). A l'évidence ceci correspond à la distribution d'équilibre de Boltzmann pour des particules indépendantes, à condition que  $\gamma D = k_B T$ , ce qui redonne la relation d'Einstein ! Ces solutions d'équilibre (courants nuls) sont à distinguer des solutions de régime permanent, pour lesquelles les courants sont de divergence nulle, mais sont non nuls.

### 4.4 Sortie d'un piège

Nombre de problèmes de transport font intervenir le passage d'une barrière énergétique grâce aux fluctuations thermiques. Le père de tous les modèles dans ce domaine est le problème à une dimension de sortie d'un piège énergétique par diffusion thermique simple. Il peut servir à comprendre la statistique de dépiégeage d'une particule adsorbée sur une surface, le temps de vie d'un complexe ligand récepteur sous une force extérieure, et bien d'autres problèmes.

Considérons une particule diffusant à une dimension (coefficient de diffusion D), sous l'action d'un potentiel W(x), qui présente un minimum en A et une barrière finie en B à droite de A. Pour simplifier la barrière est infinie à gauche de A, et la barrière en B est suivie d'une pente sans fin. La barrière d'activation est clairement  $\Delta W = W_B - W_A = W(x_B) - W(x_A)$ .

### 4.4.1 Formule de Kramers

Dans la limite où l'agitation thermique est faible par rapport aux échelles énergétiques du potentiel  $(\Delta W \gg k_B T)$ , on peut montrer à partir de l'équation de Fokker-Planck ci-dessus, que la sortie du puits



FIG. 4.1 – Puits profond avec une barrière à droite.

est très lente et peut être décrite comme un processus Poissonien avec une "constante de réaction" ou "taux de dépiégeage"  $k_p$  décroissant exponentiellement avec la hauteur de la barrière  $\Delta W$ . Le temps typique de dépiégeage  $\tau_p = 1/k_p$ , temps moyen qu'il faut à une particule dans le puits A pour sortir au dessus de la barrière, prend la forme classique (dite formule de Kramers) :

$$\tau = \tau_0 \exp(\Delta W/k_B T) \tag{4.23}$$

Le temps microscopique  $\tau_0$  dépend bien sûr de la forme du potentiel, mais également de la valeur du coefficient de diffusion D qui décrit la mobilité de la particule et fixe les échelles de temps du problème. L'analyse dimensionnelle montre qu'il doit être de la forme longueur au carré divisée par D. Kramers a montré que :

$$\tau_0 = 2\pi \frac{k_B T}{D} \left( \frac{d^2 W}{dx^2}(x_A) \right)^{-1/2} \left( \left| \frac{d^2 W}{dx^2}(x_B) \right| \right)^{-1/2} = \pi l_A l_B / D$$
(4.24)

où l'on a défini deux longueurs  $l_A$  et  $l_B$  à partir des dérivées secondes de W, dont on peut essayer de comprendre le sens physique.  $l_A = (2k_BT/W''_A)^{1/2}$  est une mesure de la taille (en x) du bassin énergétique en A, ce qui donne pour de faibles valeurs de  $k_BT$  une interprétation visuelle :  $W(x_A \pm l_A) \simeq W_A + k_BT$ . De même  $l_B = (2k_BT/|W''_B|)^{1/2}$  mesure l'étendue de la barrière à l'échelle  $k_BT$ . Pour de faibles valeur de  $k_BT$  on a donc :  $W(x_B \pm l_B) \simeq W_B - k_BT$ .

Quelques remarques importantes :

- On voit que le temps typique de sortie dépend du potentiel par trois caractéristiques (dans la limite des faibles températures) : la hauteur de la barrière, la forme du potentiel près de B ("largeur" de la barrière), et la forme du potentiel près de A (largeur du puits). Il ne dépend pas de la forme du potentiel entre ces deux zones !

- Le temps de sortie est très long comparé au temps d'équilibrage thermique local au fond du puits A qui est d'ordre  $l_A^2/D$  et donc souvent comparable à  $\tau_0$ .

- La physique est la suivante : sous l'effet de l'agitation thermique la particule dans le puits gigote typiquement de quelques  $l_A$  autour du minimum en A, et un équilibre statistique local est atteint en quelques  $\tau_0$ . De façon très rare elle arrive à s'approcher de la barrière : dans une vision marche aléatoire, celà suppose une séquence corrélée de nombreux pas vers la droite malgré le biais adverse de la force. Si elle arrive dans la zone de la barrière, alors le paysage redevient localement plat sur une distance  $\sim 2l_B$  et on a essentiellement un problème de diffusion simple. Comme la particule arrive par la gauche de la zone "plate" de taille  $\sim 2l_B$ , la probabilité qu'elle sorte par la droite est d'autant plus faible que  $l_B$  est grand. Et si elle ressort par la gauche, typiquement elle va retomber dans le puits.

### 4.4.2 Argument qualitatif

On peut en fait presque retrouver simplement la formule de Kramers (4.23)(4.24) en suivant le point précédent de façon un peu caricaturale. Notons C et D les points situés à  $l_B$  de part et d'autre de la barrière (voir Figure 4.1). Supposons qu'il y a N particules (non interagissantes) dans le puits à un instant donné. La barrière apparaît comme une fuite très lente qui permet à quelques rares particules de s'échapper, les autres restant à l'équilibre thermodynamique au sein du puits. N ne va donc quasiment pas varier à une échelle de temps courte, et on cherche à évaluer la valeur du courant de fuite au dessus de la barrière.

En caricaturant comme annoncé, on peut postuler : (i) tout ce qui est à gauche de C est à l'équilibre thermodynamique, (ii) toute particule arrivant en D disparaît rapidement par chute vers la droite, (iii) entre C et D force et agitation thermique jouent un rôle comparable. En décrivant les populations aux différentes positions par une concentration c(x), le postulat (i) donne  $c_C = c_A \exp[-(\Delta W - k_B T)/k_B T]$ , le postulat (ii) donne  $c_D \simeq 0$ , et le dernier donne en ordre de grandeur le courant de particules dans la zone entre C et D :  $J \sim -D(c_D - c_C)/(2l_B)$ .

On a donc une relation entre le courant J et la concentration en bas du puits  $c_A$  de la forme  $J \sim D(c_A/l_B) \exp[-\Delta W/k_BT]$  à une constante près que le caractère simplificateur de notre traitement ne permet pas de déterminer. Pour relier le courant au nombre total N de particules dans le puits (et non pas exactement en A), on peut de nouveau invoquer l'équilibre thermodynamique au sein du puits :  $N \simeq \int dx c_A \exp[-(W(x) - W_A)/k_BT]$ . L'essentiel des particules se trouvent près de A, où le potentiel a pour forme  $W(x) \simeq W_A + k_B T(x/l_A)^2 + \dots$  en limitant ce développement au deuxième ordre on trouve  $N \simeq c_A l_A$ .

En regroupant les résultats ci-dessus on voit que le courant de fuite J, qui est le nombre de particules traversant la barrière par unité de temps, est de la forme  $J = N/\tau_p$ , ce qui définit bien une cinétique de "réaction de dépiégeage" de temps caractéristique  $\tau_p$ . En remettant les différents facteurs en place, nous trouvons donc  $\tau_p \simeq (l_A l_B / D) \exp[\Delta W / k_B T]$  à une constante près, conforme à la formule de Kramers.

### 4.5 Conclusions du chapitre

L'agitation thermique confère une évolution aléatoire, erratique, bruitée aux objets immergés dans un solvant. Ce phénomène, la diffusion thermique, conduisant à des déplacements variant en racine carrée du temps, est particulièrement notable pour les objets submicroniques. Il est caractérisé par un nombre, le coefficient de diffusion D, directement relié au coefficient de friction  $\gamma$  de l'objet par la formule d'Einstein  $D\gamma = k_B T$ . Cette relation est telle que tous les effets dynamiques de l'agitation thermique décrits ici sont compatibles avec l'équilibre thermodynamique, et donc en particulier avec tous les effets entropiques décrits au chapitre 3.

L'équation de Langevin permet de décrire l'évolution d'un objet sous l'effet combiné de l'agitation extérieure et de forces (dues par exemple à des attractions par d'autre objets comme décrites au chapitre précédent, ou dues à des instruments de micromanipulation comme ceux qui seront présentés au chapitre 7). Une description plus générale qui permet de décrire également plus macroscopiquement une population d'objets est l'équation de Fokker-Planck.
## Chapitre 5

# Hybridation de l'ADN et de l'ARN

## 5.1 Introduction

Ce chapitre porte sur l'hybridation, le processus de reconnaissance spécifique entre deux brins d'un acide nucléique, ADN et/ou ARN. Les molécules d'ADN et d'ARN peuvent exister sous forme simple brin ou double brin. Dans la cellule l'ADN est principalement sous forme double brin (deux simple brins complémentaires associés entre eux) contrairement à l'ARN (principalement un seul brin replié sur lui même). La formation d'un duplex à partir de deux brins est appelée hybridation tandis que la transition d'un duplex en deux brins séparés est appelé dénaturation ou fusion.

Dans la cellule biologique, la molécule d'ARN peut interagir de façon spécifique avec une séquence complémentaire d'une autres molécule d'ARN ou d'ADN. De plus, l'hybridation entre des séquences à l'intérieur de la molécule permet à l'ARN d'adopter une conformation tridimensionelle complexe. Ainsi certaines molécules d'ARN sont même capable d'interagir de façon très spécifique avec des protéines. A travers leurs interactions spécifiques avec des acides nucléiques et des protéines les molécules d'ARN jouent un rôle important dans la régulation des processus biochimiques de la cellule.

De façon générale, une compétition entre énergies de liaison et entropie intervient dans les interactions spécifiques et non spécifiques, intermoléculaires et intramoléculaires. Nous adressons ici la question de comment mesurer, quantifier et modéliser un processus de reconnaissance spécifique entre biomolécules. On traite l'hybridation de l'ADN et de l'ARN car à l'heure actuelle c'est l'exemple le plus étudié et le mieux décrit de façon quantitative parmis les différentes interactions spécifiques entre biomolécules. L'hybridation est également à la base de plusieurs techniques importantes, la PCR, les puces à ADN, la détection de mutations et autres. Une de ces applications sera considérée dans le chapitre suivant.

### 5.2 Approches expérimentales

Il existe plusieurs techniques qui permettent de caractériser expérimentalement l'équilibre entre les états simple brin et double brin de l'ADN. Le principe est de mesurer la fraction des paires de bases appariées en fonction de la température. Un signal dépendant du caractère "ouvert" ou "fermé" peut être obtenu par absorption UV (souvent à 260 nm), fluorescence (avec des fluorophores s'intercalant entre les bases du duplex ou en utilisant une technique de «Förster Resonant Energy Transfer» ou FRET), RMN ou diffusion Raman. Dans tous ces cas il faut faire attention aux dépendances résiduelles en température de la grandeur mesurée<sup>1</sup>. De façon alternative, on peut aussi mesurer par calorimétrie la variation d'enthalpie  $\Delta H$  associée à l'hybridation.

L'absorption UV à 260 nm par exemple est plus grande pour une base ouverte que pour une base fermée. Lorsque une solution aqueuse contenant de l'ADN en volume est chauffée, on observe une transition de l'état double brin (état basse température) à l'état simple brin (état haute température). Souvent cette transition peut être caractérisée par deux paramètres, une température de fusion  $T_m$  et une pente  $d\Theta/dT|_{T=T_m}$ , où  $\Theta$  designe la fraction des brins sous forme de duplex. Pour contourner des difficultés

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Analysis of Thermal Melting Curves, J.- L. Mergny and L. Lacroix, Oligonucleotides 13, 515 (2003)

expérimentales (condensation, évaporation, dépendence de la fluorescence à la température,...) on complète les donnés par des mesures de référence effectuées avec des séquences de bases qui ne présentent pas de transition dans la même intervalle de température. Ainsi on peut obtenir un profil intrinsèque de la transition simple brin/double brin, un exemple est présenté sur la figure 5.1.

Souvent on souhaite caractériser l'interaction spécifique entre les brins à une température T qui est éloignée de la température de fusion  $T_m$  et prédire la fraction des brins sous forme de duplex en fonction de la concentration des brins. Une application particulièrement intéressante d'un point de vue biologique est d'estimer avec quelle probabilité une molécule d'ARN présente dans la cellule à une concentration donnée occupe un site spécifique pour empecher la transcription d'un gène.

Pour les deux séquences de la figure 5.1 on note que pour la concentration de brins utilisé dans l'expérience, l'ADN est sous forme duplex à la température du corps 37°C. Cependant, pour savoir lequel des deux duplex est plus stable à 37°C et comment l'équilibre entre l'état "brins séparés" et l'état "brins sous forme de duplex" varie avec la concentration il faut une analyse théorique supplémentaire. Cette description théorique est sujet de la section suivante.



**Figure 5.1.** Profils intrinsèques de la transition de l'ADN double brin (basse température) vers l'ADN simple brin (haute température) pour deux séquences différentes, mesurés par une technique d'absorption de lumière dans l'ultraviolet (absorption UV à 260 nm). Mergny et al, 2003.

## 5.3 Description théorique de l'équilibre entre deux états

Nous considérons une solution contenant deux types de molécules d'ADN,  $S_1$  et  $S_2$ . La séquence de  $S_1$  est complémentaire à celle de  $S_2$ , mais pas à elle même. Nous traitons l'hybridation comme une réaction entre deux états (brins séparés et duplex) caractérisée par une constante d'équilibre  $K_D$ .

$$S_1 + S_2 \rightleftharpoons L$$

La concentration totale des brins est

$$c_T = [S_1] + [S_2] + 2[D] \tag{5.1}$$

et la fraction des brins sous forme de duplex est

$$\Theta = \frac{2[D]}{c_T} \tag{5.2}$$

La loi d'action de masse nous donne à l'équilibre

$$K_D = \frac{[D]}{[S_1][S_2]} = e^{-\frac{\Delta H - T\Delta S}{k_B T}}$$
(5.3)

Pour une interaction entre séquences complémentaires on trouve expérimentalement que les changments d'enthalpie et d'entropie  $\Delta H$  et  $\Delta S$  sont négatifs (voir section 5.4).

Si  $\Delta H$  et  $\Delta S$  ne dépendent pas de la température T, cas considéré ici, on peut dériver de l'équation 5.3 la relation de van t'Hoff,

$$\Delta H = k_B T^2 \frac{\partial \ln K_D}{\partial T} \tag{5.4}$$

Nous supposons la même concentration pour les deux séquences  $[S_1] = [S_2]$ . On obtient des équations 5.1 - 5.3,

$$\begin{bmatrix} D \end{bmatrix} = \frac{c_T \Theta}{2}$$
$$\begin{bmatrix} S_1 \end{bmatrix} = \frac{c_T}{2} (1 - \Theta)$$
$$K_D = \frac{2}{2\pi} \frac{\Theta}{(1 - \Theta)^2}$$
(5.5)

 $\operatorname{et}$ 

$$K_D = \frac{2}{c_T} \frac{\Theta}{(1-\Theta)^2} \tag{5.5}$$

La mesure de  $\Theta(T)$  permet de déterminer les paramètres  $\Delta H$  et  $\Delta S$ . Il suffit de tracer  $K_D(T)$  sous la forme  $\ln K_D$  versus 1/T, car  $\ln K_D = -\frac{\Delta H}{k_B T} + \frac{\Delta S}{k_B}$ , selon l'équation 5.3. Souvent les deux paramètres sont extraits de la valeur de  $T_m$  et de la pente  $\frac{\partial \Theta}{\partial T}\Big|_{T=T_m}$ . Dans la suite de cette section nous allons dériver les deux expressions correspondantes.

L'injection de l'équation 5.5 dans 5.4 donne

$$\Delta H = k_B T^2 \frac{\partial}{\partial T} \ln \left( \frac{2\Theta}{c_T (1-\Theta)^2} \right) = k_B T^2 \left( \frac{1}{\Theta} \frac{\partial \Theta}{\partial T} + \frac{2}{1-\Theta} \frac{\partial \Theta}{\partial T} \right)$$

et pour  $T = T_m$  où  $\Theta = 0.5$  nous obtenons une relation entre la pente  $\partial_T \Theta$  et la différence d'enthalpie  $\Delta H$ 

$$\Delta H = 6k_B T_m^2 \left. \frac{\partial \Theta}{\partial T} \right|_{T=T_m} \,. \tag{5.6}$$

Pour  $\Theta = 0.5$  nous avons  $K_D = 4/C_T$  et de l'équation 5.3,

$$\Delta H - T_m \Delta S = -k_B T_m \ln \frac{4}{c_T}$$
$$\Rightarrow \frac{1}{T_m} = \frac{\Delta S}{\Delta H} + \frac{k_B}{\Delta H} \ln \left(\frac{c_T}{4}\right)$$

On peut donc aussi déterminer  $\Delta H$  et  $\Delta S$  à partir des mesures de  $T_m$  à plusieurs concentrations  $c_T$ , en traçant  $1/T_m$  en fonction de  $\ln(c_T/4)$ .

Pour la température de fusion  $T_m$  nous trouvons

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + k_B \ln \left( c_T / 4 \right)} \tag{5.7}$$

Lorsque  $c_T$  augmente, l'équilibre de la réaction de reconnaissance se déplace en faveur de l'état duplex et la température de fusion  $T_m$  augmente.

Le tableau 5.1 donne les expressions théoriques de  $K_D$ ,  $T_m$  et  $\Delta H$  pour trois types de réactions d'association, respectivement la réaction bimoléculaire entre brins non-auto-complémentaires (cas considéré ici), la réaction bimoléculaire entre brins auto-complémentaires et la réaction intramoléculaire. Par exemple, la séquence de base d'ADN CGGC est non-auto-complémentaire (elle est complémentaire à GCCG), celle de CATG en revanche est auto-complementaire. Contrairement aux réactions intermoléculaires, l'équilibre de la réaction intramoléculaire ne dépend pas de la concentration  $c_T$ .

Inter-moléculaire		Intra-moléculaire
Non-autocomplémentaire	autocomplémentaire	
$S_1 + S_2 \rightleftharpoons D$	$2S \rightleftharpoons D$	$S \rightleftharpoons D$
$K_D = \frac{2\theta}{c_T \left(1 - \theta\right)^2}$	$\frac{\theta}{2c_T\left(1-\theta\right)^2}$	$\frac{\theta}{1-\theta}$
$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + k \ln \frac{C_T}{4}}$	$\frac{\Delta H}{\Delta S + k \ln C_T}$	$\frac{\Delta H}{\Delta S}$
$\Delta H = 6kT_m^2 \left. \frac{\partial \theta}{\partial T} \right _{T=T_m}$		$4kT_m^2 \left. \frac{\partial \theta}{\partial T} \right _{T=T_m}$

**Tableau 5.1.** Expressions théoriques de  $K_D$ ,  $T_m$  et  $\Delta H$  pour trois types de réactions d'association à l'équilibre thermodynamique.

### Application pratique

Nous sommes maintenant en mesure de repondre à la question suivante, déjà formulée à la fin de la section "approches expérimentales". Laquelle des deux séquences de bases utilisé dans les mesures de la figure 5.1 est plus stable à 37°C, la température du corps? De la figure on estime les paires de valeurs expérimentales  $(T_m, \frac{\partial \Theta}{\partial T}|_{T_m})$  suivantes, (60°C, 0.11 K<sup>-1</sup>) pour les cercles et (70°C, 0.063 K<sup>-1</sup>) pour les triangles. De l'équation 5.7 nous avons

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} - k_B \ln c_T / 4$$

d'où

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + k_B T \ln c_T / 4$$
(5.8)

Nous choisissons ici comme unité d'énergie l'énergie thermique  $k_B T_{310K}$  correspondant à la température du corps 37°C. De l'équation 5.6 nous trouvons ainsi  $\Delta H \simeq -236 k_B T_{310K}$  pour les cercles et  $-143 k_B T_{310K}$  pour les triangles. Pour répondre à la question posée il suffit de calculer le terme proportionel à  $(1 - T/T_m)$  de l'équation (5.8), si les deux séries de mesures ont été effectues avec la même concentration  $c_T$  de brin. Ce terme vaut  $-16.3 k_B T_{310K}$  pour les cercles et  $-13.8 k_B T_{310K}$  pour les triangles. Par conséquent, la séquence qui a la valeur de  $T_m$  plus petite est neanmoins plus stable à 37°C. Cette exemple illustre bien l'importance de l'analyse théorique. En général la température de fusion  $T_m$  n'est pas suffisante pour quantifier la stabilité d'un duplex.

### Limitations de cette description

Dans le cadre du modèle présenté ici on utilise deux paramètre  $\Delta H$  et  $\Delta S$  pour caractériser la réaction de reconnaissance. On suppose que les deux paramètres sont constants, i.e. ne dépendent pas de la température et de la concentration de brins. Afin de vérifier expérimentalement que la description est appropriée, on peut tracer ln  $K_D$  versus 1/T et  $1/T_m$  versus  $\ln c_T$ , dans la gamme de validité du modèle on doit obtenir une droite pour ces deux représentations.

Le modèle simple ne décrit pas les situations avec plusieurs transitions. Par exemple quelques séquences de bases sont susceptible de former des triples hélices à basse température. De façon générale la présence de plus de deux états n'est pas toujours clairement visible dans la courbe  $\Theta(T)$ . Par exemple, si les molécules simples brins présentent des structures intramoléculaires la formation du duplex à partir de deux simple brins fait intervenir trois transitions (dénaturation de la structure du simple brin A, dénaturation de la structure du simple brin B et formation du duplex A/B). Dans cette situation les valeurs  $\Delta H$  et  $\Delta S$ extraites d'une mesure représentent des valeurs effectives qui dépendend de la thermodynamique des trois réactions.

Si on mesure trop vite, i.e. si on ne laisse pas suffisament de temps aux molécules de se rencontrer par diffusion pour établir l'équilibre de la réaction de reconnaissance, on observe une hystérèse. Cette hystérèse est relativement facile à voir comme une différence systématique entre les courbes  $\Theta(T)$  mesurées en chauffant et en refroidissant, mais peut être difficile à éviter expérimentalement si la cinétique est lente. L'hystérèse n'est pas prise en compte dans la présente description basée sur l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique.

## 5.4 Un modèle pour prédire $\Delta H$ et $\Delta S$ à partir de la séquence

Dans des conditions expérimentales appropriées, c'est à dire pour des séquences courtes et sans structure secondaire (typiquement des oligonucléotides avec moins de 20 bases), l'approche présentée permet de bien décrire l'équilibre de l'hybridation et dénaturation et de déterminer expérimentalement les paramètres  $\Delta H$  et  $\Delta S$  avec une bonne précision. Un ensemble de 108 oligonucleotides de taille et de séquence variable a été analysé. Ces mesures ont permis de développer un modèle pour calculer  $\Delta H$  et  $\Delta S$  en fonction de la séquence de base que nous présentons dans cette section.

La double hélice est stabilisée par deux contributions énergétiques : les liaisons hydrogènes et l'interaction hydrophobe de l'empilement des bases. Ces contributions dépendent du type de paire de base (GC ou AT) et l'énergie gagnée par l'empilement d'une paire dépend des paires voisines. Ceci suggère un modèle qui tient compte de chaque paires de bases et de l'interaction avec les bases des premiers voisins.

Pour initier la formation d'un duplex il faut fermer une première paire, à ce stade il y a seulement des liaisons hydrogènes mais pas d'empilement. La pénalité énergétique correspondante est décrit par une énergie d'initiation. Ensuite la propagation de l'hélice est caractérisée par des paramètres de type premier voisin, par exemple pour la formation d'une paire G/C sur une paire A/T etc. Si on permet uniquement les deux types de paires de base décrites par Watson et Crick, on voit qu'il y a 10 couples de premiers voisins différents possible. Avec le paramètre d'initiation et un paramètre caractérisant la paire terminale, on obtient un modèle à 12 paramètres. Le tableau 5.2 montre les valeurs de ces paramètres pour des séquences d'ADN dans un tampon aqueux à pH 7 et 1M NaCl. Ces valeurs ont été déduites par regression linéaire d'un ensemble de mesure de  $\Theta(T)$  sur les 108 oligonucléotides différentes mentionnés ci-dessus<sup>2</sup>.

On note que la différence d'énergie libre  $\Delta G$  pour la formation d'une paire est seulement de 1-4  $k_B T_{300K}$  (23 kcal/mol=1eV=40  $k_B T_{300K}$ ). Une seule paire peut donc s'ouvrir facilement par simple activation thermique. En revanche pour une séquence de plusieures paires de bases on obtient en collectif une valeur de  $\Delta G$  qui est grande par rapport à  $k_B T$ . Par conséquent, la molécule est globalement stable, mais s'ouvre et referme localement sous l'effet de l'agitation thermique.

Considérons l'exemple d'une hybridation entre la séquence 5'-GTTGA et son complémentaire et calculons  $\Delta G$  à 37°C avec les paramètres du tableau 5.2.

$$\Delta G = \left(\sum \Delta G_{stack}\right) + \Delta G_{init} + \Delta G_{termAT}$$
  
=  $GT + TT + TG + GA + \Delta G_{init} + \Delta G_{termAT}$   
=  $-1.44 - 1.00 - 1.45 - 1.30 + 1.96 + 0.05$   
=  $-3.18 \text{ kcal/mol} = -5.53 k_B T_{300K}$ 

De plus, il existe des paramètres pour décrire l'interaction entre deux séquences qui ne sont pas parfai-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>The Thermodynamics of DNA Structural Motifs, J. SantaLucia and D. Hicks, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 33, 415 (2004)

Séquence	$\Delta H$	$\Delta S$	$\Delta G_{37}$
	(kcal/mol)	$\operatorname{cal}/(\operatorname{mol}\mathrm{K})$	$\rm kcal/mol$
AA/TT	-7.6	-21.3	-1.00
AT/TA	-7.2	-20.4	-0.88
$\mathrm{TA}/\mathrm{AT}$	-7.2	-21.3	-0.58
$\mathrm{CA}/\mathrm{GT}$	-8.5	-22.7	-1.45
$\mathrm{GT/CA}$	-8.4	-22.4	-1.44
CT/GA	-7.8	-21.0	-1.28
GA/CT	-8.2	-22.2	-1.30
$\mathrm{CG/GC}$	-10.6	-27.2	-2.17
$\mathrm{GC}/\mathrm{CG}$	-9.8	-24.4	-2.24
GG/CC	-8.0	-19.9	-1.84
Initiation	+0.2	-5.7	+1.96
Terminal AT	+2.2	+6.9	+0.05

**Tableau 5.2.** Paramètres thermodynamiques pour des paires Watson-Crick d'ADN à 1M NaCl dans le cadre du modèle premier voisin. La contribution "terminal AT" s'applique pour chaque extrémité terminée par une paire AT. La notation de séquence correspond à la convention 5' vers 3', voir aussi l'exemple du calcul de  $\Delta G$  ci-dessous. SantaLucia et al, 2004.

tement complémentaires, i.e. où le duplex peut contenir des mésappariements et/ou des boucles. Cette extension est intéressante pour calculer l'effet d'une mutation et la stabilité d'une molécule simple brin se repliant sur elle-même.

De façon générale, les modèles basés sur l'ensemble de ces paramètres aident à prédire les structures secondaires des acides nucléiques simple brin, sujet de grand importance biologique notamment pour le rôle des molécules d'ARN comme enzyme et comme agent de régulation cellulaire. De plus ils permettent de choisir des séquences de bases pour optimiser la spécificité de la reconnaissance de séquences. Ce point est important pour la mise en place et l'optimisation des techniques de biologie moléculaire, comme la PCR et les puces à ADN par exemple. Basées sur le modèle de premier voisin présenté ici, plusieurs sites WEB proposent aujourd'hui un calcul numérique de valeurs thermodynamiques  $(T_m, \Delta H, \Delta S, \Delta G)$  et de structures secondaires à partir de la séquence de base pour l'ADN et l'ARN.

## 5.5 Conclusions du chapitre

- 1. L'hybridation de l'ADN et de l'ARN est à l'heure actuelle l'exemple le plus étudié et le mieux décrit de façon quantitative parmis les différentes interactions spécifiques entre biomolécules.
- 2. L'hybridation joue un rôle primordial au niveau de la biologie moléculaire et est à la base de plusieurs techniques importantes pour le diagnostique médical, telles la PCR et les puces à ADN.
- 3. Il existe plusieurs techniques qui permettent de caractériser expérimentalement l'équilibre entre l'état "simple brin" et l'état "duplex".
- 4. Nous avons présenté dans ce chapitre une description théorique de l'hybridation à l'équilibre et ont expliqué comment on peut déterminer à partir des données expérimentales les changements d'enthalpie et d'entropie.
- 5. Un modèle numérique, basé sur un jeu de paramètre obtenu par un ensemble de mesures avec différentes séquences, a été presenté. Il permet de prédire la stabilité (calcul de  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  et  $\Delta G$  en fonction de T et de n) et les structures secondaires à partir de la séquence de base.

## Chapitre 6

# Puces à ADN

Ce chapitre est consacré à une application importante de l'hybridation entre brins d'ADN, les puces à ADN. La technique permet une analyse parallèle d'un grand nombre d'interactions différentes et devient importante pour la génomique et le domaine biomédical.

Un champ d'application des puces à ADN sont les études de l'expression des gènes qui nécessitent de mesurer la quantité relative des différentes ARN messagers de la cellule. Les niveaux d'expression des gènes dans la cellule s'adaptent en réponse à de nombreux signaux extra et intracellulaires. C'est par exemple le cas lorsque une cellule devient cancéreuse ou est exposée à un medicament. Un autre champ d'application important est le diagnostique d'ADN avec notamment l'analyse des différences de la séquence d'ADN d'un individu à l'autre. Identifier les corrélations entre ces différences génomiques et les variations dans la prédisposition à une maladie ou dans l'efficacité d'un traitement donné est particulièrement pertinant d'un point de vue medical.

Dans la section 6.1, nous présentons la technologie des puces à ADN. La section suivante contient une analyse de l'influence de la surface sur l'hybridation, en complément du chapitre 5 sur l'hybridation en solution. Dans la section 6.3, nous décrirons une approche récente de détection électronique de biomolécules. Dans le cadre des puces a ADN cette approche de détection peut potentiellement apporter des avantages techniques et économiques par rapport à la procédure classique qui est basée sur la fluorescence.

## 6.1 Déscription de la technologie des puces à ADN

Les puces à ADN réposent sur la spécificité de l'hybridation entre deux simple brins complémentaires. La puce en elle-même est constituée d'une surface solide d'environ un  $cm^2$  sur laquel sont effectués plusieurs (jusqu'à l'ordre de  $10^6$ ) microdépôts d'ADN simple-brin. Chaque microdépôt ne contient qu'un type d'ADN de séquence connue, mais la séquence varie d'un dépôt à l'autre. Cette matrice 2D de sondes va permettre d'analyser des acides nucléiques simples brins de séquences inconnues, appelés cibles. Il existe un certain nombre de variations de cette technologie, ici nous en mentionons les plus courantes.

La figure 6.1 illustre une methode classique d'analyse par puce à ADN de la variation du profil d'expression des gènes entre un échantillon de cellules de contrôle et un échantillon de ces mêmes cellules ayant connu des conditions de croissance différentes (échantillon expérimental).

### 6.1.1 Sondes

Commes molécules sondes on emploie souvent des oligonucléotides d'une taille comprise entre 10 et 50 bases et parfois des fragments double brin obtenus par PCR. Les séquences des différentes sondes sont optimisées pour permettre une hybridation sélective, e.g. pour détecter la présence d'un ARNm connu ou d'une mutation. Le modèle numérique décrit dans le chapitre 5.4 est un outil indisponsable pour ce choix des séquences des sondes. Souvent les molécules sondes portent à une extrémité une modification chimique qui permet un greffage covalent sur le support solide. Une solution contenant des molécules sondes diluées est déposée localement sur la surface chimiquement activée, avec une pointe fine de microdépôt ou un dispositif piezoélectrique. Le diamètre d'un tel dépôt est ~100  $\mu$ m et la distance entre les spots est aussi



**Figure 6.1.** Analyse par puce à ADN de la variation du profil d'expression des gènes entre un échantillon de cellules de contrôle et un échantillon expérimental. Les ARNm issues de cellules de contrôle sont extraits puis convertis en molécules d'ADN marqués avec un fluorophore vert (ADNc marqué Cy3). De manière analogue, les ARNm issues de l'échantillon expérimental sont isolés puis convertis en ADNc marqués avec un fluorophore rouge (Cy5). Les ADNc sont ensuite mélangés en proportions égales avant d'être hybridés sur la puce. L'image de fluorescence deux couleurs de la puce, réalisée par exemple avec un microscope confocal, révèle une série de spots colorés. L'intensité du signal de fluorescence vert ou rouge est supposée proportionnelle à la quantité d'ARNm initialement présente dans chacun des échantillons de cellules.

de l'ordre de 100  $\mu$ m. Dans une approche alternative les oligonucléotides sont synthétisés directement sur la puce, la séquence de bases est définie par un jeux de masques et on arrive à des diamètres de spot plus petits, actuellement jusqu'à 5  $\mu$ m.

### **6.1.2** Cibles

On souhaite souvent mesurer les concentrations relatives de différentes molécules d'ARN messager. Après l'extraction de ces ARNm des cellules biologiques, on y attache des fluorophores. Deux sortes de fluorophores différents sont utilisés lorsqu'on souhaite une analyse comparative à deux couleurs de deux échantillons. On utilise de l'ADN comme molécule cible si on veut directement analyser un échantillon d'ADN génomique ou si on préfère la synthèse enzymatique des molécules d'ADNc fluorescents par rétrotranscription de l'ARNm à la modification chimique des ARNm avec des fluorophores.

### 6.1.3 Hybridation

L'hybridation se fait sur la surface de la puce à ADN, dans un milieu aqueux en présence de sel et à température controllée. Dans le chapitre 5 nous avons traité l'hybridation en solution. Une particularité des biopuces est que l'interaction spécifique a lieu à l'interface liquide/solide. L'effet de cet interface sur l'hybridation sera discuté plus loin, dans le chapitre 6.2. Après l'hybridation suivent quelques étapes de

lavage pour enlever les cibles qui ne se sont pas attachées à la surface à travers une hybridation avec les sondes.

### 6.1.4 Détection

Dans l'approche classique de détection d'hybridation, on sèche la puce et mesure ensuite sa fluorescence. Les dispositifs commerciaux de fluorescence emploient souvent deux faisceaux laser de couleurs différentes, vert et rouge ( $\lambda$ =532 nm et 633 nm) et font un scan de la surface de la puce avec une résolution spatiale typique de l'ordre de 10  $\mu$ m. Les différents spots ont des intensités différentes, il y a des endroits avec plus de signal dans le rouge et des endroits avec plus de signal dans le vert.

### 6.1.5 Analyse des signaux de fluorescence

Dans l'analyse comparative classique à deux couleurs illustré sur la figure 6.1 on suppose que l'intensité relative observée avec les deux couleurs sur une sonde donnée représente le nombre relatif des cibles correspondantes dans les deux échantillons. Une comparaison quantitative entre les signaux mesurés sur deux régions de sondes différentes est plus difficile, car il faut tenir compte du fait que deux duplex différents ont en général deux températures de fusion  $T_m$  différentes. Aujourd'hui on cherche encore rarement à faire une analyse quantitative des signaux basée sur une description théorique de l'hybridation. Une telle analyse serait probablement utile. Elle peut même devenir indispensable si on souhaite comparer des résultats obtenus par différentes laboratoires sur différentes puces à ADN avec différentes séquences de sonde. A l'heure actuelle, il n'y a pas d'unification des méthodes d'analyse des expériences sur puces à ADN. Par ailleurs l'enorme quantité de données générée pose le problème du stockage de ces informations sous un format accessible par tous. Tous ces aspects constituent aujourd'hui de véritables sujets d'étude en bioinformatique.

## 6.2 Influence de la surface sur l'hybridation

L'influence de la surface est un élément important dans une description quantitative des signaux d'hybridation mesurés sur puce à ADN. Sur une puce à ADN on peut étudier, comme en volume, la formation des différents duplex entre oligonucléotides et déterminer les différences d'énergie libre  $\Delta G$ . Une comparaison entre l'hybridation sur puce et l'hybridation en solution montre que suivant sa charge électrostatique la surface utilisée peut stabiliser ou déstabiliser un duplex de deux brins complémentaires.

La charge de la surface joue un rôle car elle influence le potentiel électrostatique à l'endroit des sondes. Comme nous avons vu au chapitre 3, une surface chargée en contact avec un électrolyte attire des contre-ions et crée un potentiel électrostatique qui s'étend de la surface à l'intérieur de l'électrolyte jusqu'à une profondeur de quelques nm (la longueur de Debye dépendant du sel). Pour une sonde fixée directement sur la surface (par exemple un oligonucléotide 20 mer de longueur d'environ 20\*0.33 nm=6 nm) le potentiel électrostatique induit par la surface ne peut pas être négligé.

Considérons d'abord une situation ou les molécules de sonde, cible et duplex se trouvent libre en solution. L'équilibre d'une hybridation en solution est décrit par la formule

$$K = \frac{n_d}{n_s n_c} = e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}} , \qquad (6.1)$$

où  $n_s$ ,  $n_c$  et  $n_d$  désignent les concentrations volumiques des sondes, cibles et duplex. Un modèle pour calculer  $\Delta G$  à partir de la séquence à été présenté dans la section 5.4. La probabilité qu'une sonde soit occupée par une molécule cible, i.e. soit transformée en duplex, s'écrit,

$$P = \frac{n_d}{n_d + n_s} = \frac{1}{1 + (n_c K)^{-1}}$$
(6.2)

Considérant maintenant le cas d'une hybridation sur surface, nous supposons d'abord que la présence de la surface ne change pas la concentration volumique des cibles loin de la surface. Les molécules sondes s sont fixées à la surface, les molécules cibles c présentes en volume s'approchent pour former des duplex d à la surface. Les équations 6.1 et 6.2 s'appliquent également au cas d'une hybridation sur surface. Les concentrations volumiques  $n_s$  et  $n_d$  deviennent des concentrations par unité de surface, mais ce changement de définition ne modifie pas la forme des équations.

Quantitativement, le potentiel électrostatique de surface a deux effets. D'une part au voisinage de la surface la concentration volumique des cibles  $n_c^{su}$  est modifiée par rapport à sa valeur  $n_c$  dans la solution

$$n_c^{su} = n_c \ e^{-\frac{V_c}{k_B T}} , \tag{6.3}$$

où  $V_c$  est le potentiel électrostatique d'une molécule sonde à la surface. Ce potentiel est mesuré ici par rapport à sa valeur de V=0 loin (i.e. à des distances grand par rapport à la longueur de Debye  $\lambda_D$ ) dans la solution. D'autre part la constante d'équilibre K est modifiée par l'effet de charge de surface sur la différence d'énergie libre correspondant à la formation du duplex,

$$K^{su} = e^{-\frac{\Delta G^{su}}{k_B T}} = e^{-\frac{\Delta G + V_d - V_s - V_c}{k_B T}}.$$
(6.4)

Les potentiels électrostatiques  $V_d$  et  $V_s$  correspondent respectivement aux molécules duplex et aux molécules sondes. Ils sont définis de façon analogue à  $V_c$ . Il en résulte une probabilité d'hybridation d'une sonde sur la surface qui diffère du resultat Eq. 6.2 d'une sonde en solution.

$$P^{su} = \frac{1}{1 + (n_c^{su} K^{su})^{-1}} = \frac{1}{1 + (n_c K)^{-1} e^{\frac{V_d - V_s}{k_B T}}}.$$
(6.5)

La correction dépend de  $V_d - V_s$ , c'est à dire de la différence entre l'énergie de surface de la sonde et celle du duplex. Cette différence dépend du sel : d'une part le potentiel électrostatique dépend du sel et d'autre part le nombre de contre-ions supplémentaires recrutés lors de l'hybridation dépend du sel. En revanche, le potentiel de surface des cibles  $V_c$  n'intervient pas dans la probabilité d'hybridation  $P^{su}$ .

## 6.3 Détection électronique de biomolécules

### 6.3.1 Motivations et principe de la détection électronique

Les acides nucléiques sont fortement chargés en milieu aqueux. Les groupements phosphates ionisés leurs confèrent une charge négative qui est seulement partiellement neutralisée par des contre-ions, i.e. il subsiste une charge globale négative. Comme nous avons vu dans les paragraphes sur l'hybridation de l'ADN et de l'ARN en solution et en surface, l'interaction entre brins est influencée par les effets électrostatiques.

On ne peut pas seulement utiliser l'électrostatique pour influencer l'interaction entre biomolécules, mais il est également possible de détecter une biomolécule à travers sa charge intrinsèque. Une telle détection électronique directe peut être très attractive pour deux raisons principales.

- 1. Contrairement aux techniques classiques de détection, elle ne necessite pas de marquage des acides nucléiques. Même si les marqueurs radioactifs, fluorescents ou enzymatiques sont couramment employés aujourd'hui, l'étape de marquage complique de façon significative le procédé de détection, avec des risques d'erreurs et des coûts associés.
- 2. La procedure de lecture des résultats peut être simplifiée. Pour la fluorescence, par exemple, il faut un système de détection de lumière convertissant un signal optique en un signal électrique approprié à l'acquisition numérique. Dans le cas d'une approche de détection électronique basée sur un dispositif à base de silicium en revanche, il est même possible d'intégrer détection et traitement des donnés dans la même puce.

Lorsque des molécules chargées se trouvent en solution à proximité d'une surface solide, plus précisément à une distance inférieure ou de l'ordre de la longueur de Debye, leur présence modifie le potentiel électrostatique de l'interface entre le liquide et le solide. Par la suite, nous présentons une approche, qui, pour mesurer cette modification du potentiel d'interface, utilise un substrat à base de silicium avec des transistors intégrés à quelques nanomètres sous la surface.



**Figure 6.2.** Schéma d'une structure de biocapteur à base de transistor à effet de champs et principe de la mesure électronique. Pouthas et al, 2004.

### 6.3.2 Structures de transistor et mesure électrique

La figure 6.2 montre une coupe transversale d'un biocapteur basé sur un réseaux de transistors à effet de champ (en anglais : "field effect transistor" ou FET). On peut intégrer plusieurs structures de transistor, électriquement isolées l'une de l'autre, dans le même substrat de silicium. Deux structures sont présentés sur le schéma. Pendant la mesure électronique la surface du capteur est baignée par une solution aqueuse de faible concentration saline, appellée électrolyte. La structure semiconductrice est isolée de l'électrolyte par un oxyde SiO<sub>2</sub> très mince. L'électrolyte peut être polarisé par rapport au semiconducteur à travers une électrode Ag/AgCl. Le fonctionnement de l'électrode est basé sur un échange des ions chlorure Cl<sup>-</sup> entre le métal argent et la solution.

Si un voltage  $U_{SE}$  de polarité approprié est appliquée entre le silicium et l'électrolyte, un gaz bidimensionnel de porteurs de charge se forme à l'interface Si/SiO<sub>2</sub>. Pour l'exemple du schéma, avec un substrat de silicium dopé n, le gaz 2D sera composé de porteurs positivement chargés ("p-channel"). La distance entre ce gaz 2D et l'interface SiO<sub>2</sub>/électrolyte est très petite, de l'ordre de quelques nm. C'est pour cette raison que la densité et la mobilité des porteurs de charge du gaz 2D dépendent de façon sensible du potentiel électrostatique de l'interface entre l'oxide SiO<sub>2</sub> et l'électrolyte.

Par conséquent, une façon de détecter électroniquement des biomolécules consiste à les immobilisées à l'interface entre l'oxyde SiO<sub>2</sub> et l'électrolyte et de mesurer le changement correspondant dans la conductivité électrique du gaz 2D. Dans cet objectif, le gaz 2D de chaque transistor est contacté électriquement grace à deux régions dopées p. Ces deux régions, appellées source et drain, sont latéralement séparées de quelques micromètres. La mesure de la conductivité électrique du gaz 2D entre source et drain donne ensuite pour chaque transistor un signal électronique dépendant du potentiel électrostatique de l'interface entre l'oxyde SiO<sub>2</sub> et l'électrolyte. Avec un réseaux de transistor on peut ainsi même déterminer la variation du potentiel d'interface en fonction de la position laterale sur la surface du capteur.

On mesure le courant de drain  $I_D$  de chaque transistor en fonction de deux tensions. La première tension,  $U_{SD}$  est appliquée entre source et drain et la deuxième,  $U_S$  entre l'électrolyte et la source. Lorsque le courant  $I_D$  d'un transistor est mesuré en fonction de  $U_S$ , à  $U_{SD}$  fixe, on obtient une courbe de la forme montré schématiquement sur la figure 6.3. Pour une charge positive supplémentaire sur la surface on s'attend à une diminution du courant à cause de la répulsion électrostatique, tandis que l'ajout d'une charge négative sur la surface augmente le courant de drain  $I_D$ . Lorsqu'on garde la paire de valeurs  $\{U_{SD}, I_D\}$  constante, on s'attend à un décalage  $\Delta U_S > 0$  ( $\Delta U_S < 0$ ) pour l'apport de charge positive (négative).

#### 6.3.3 Détection de l'ADN

Dans ce paragraphe nous illustrons un protocol de détection électronique de molécules d'ADN immobilisées à travers des interactions électrostatiques sur un réseau de transistors. Les 96 transistors du réseau sont arrangés linéairement sur une longueur de 2 mm et chaque FET a une surface active de  $10 \times 10 \ \mu$ m. Après quelques étapes de préparation destinées à rendre la surface du capteur positive pour permettre une adsorption directe de l'ADN par interaction électrostatique (étapes de nettoyage et de dé-



**Figure 6.3.** Caractéristique courant/tension d'un biocapteur à effet de champs et modification de celle-ci lors d'un apport de charge positive et négative.

position d'une couche mince de polymères positivement chargés) une mesure électronique de référence est effectuée selon la procédure décrit à la fin du paragraphe précédent. Ensuite la puce est séchée et avec un dispositif robotique plusieurs microdépôts de solution d'ADN sont effectués sur le réseau de transistors. La figure 6.4 montre une image microscopique d'une partie d'un réseau avec deux microdépôts.



**Figure 6.4.** Deux microdépots sur un réseau de transistor. Chaque dépot couvre plusieurs transistors. Les transistors individuels (carrés blanc) sont arrangés selon un réseau linéaire d'une période de 20  $\mu$ m. En bas d'image on peut voire les connexions électriques des drains (lignes en gris clair) intégrées dans la puce. La région homogène obervable en haut de l'image, contacte les sources des différents transistors en parallèle.

Après ce dépôt local de l'ADN, la surface est de nouveau couverte de la solution d'électrolyte, l'électrode Ag/AgCl est introduite et les caractéristiques courant-tension sont mesurées. La différence entre cette mesure et la mesure de reférence effectuée avant les dépôts est présentée sur la figure 6.5. La figure montre le décalage en  $U_S$  à  $\{I_D, U_{SD}\}$  fixés en fonction de l'index du transistor; l'index est proportionnel à la position du transistor dans le réseau linéaire. Dans cette représentation les régions avec de l'ADN adsorbé donnent des peaks marqués vers le bas. Un dépôt de contrôle (solution de H<sub>2</sub>O sans ADN) effectué au niveau du transistor 5 ne donne pas de signal.

Comme nous avons vu avec la figure 6.3, un décalage  $\Delta U_S$  négatif est attendu pour un ajout de charge négative. L'observation d'un décalage  $\Delta U_S$  négatif induit par une adsorption locale des molécules d'ADN chargées négativement est en accord avec cette interprétation simple. Une description plus précise du signal électronique nécessite cependant de tenir compte de l'écrantage des charges par les ions mobiles de l'électrolyte. On observe effectivement que l'amplitude des peaks induits par l'ADN diminue lorsque



**Figure 6.5.** Décalages  $\Delta U_S$  des caractéristiques courant/tension induites par une adsorption locale de l'ADN sur un réseau de transistors. L'adsorption locale est obtenue en effectuant plusieurs microdépôts de solutions d'ADN. Chaque dépôt individuel a un diamètre d'environ 200 µm et couvre ~10 transistors. Gentil et al, 2007.

la teneur en sel de l'électrolyte augmente <sup>1</sup>. L'écrantage de charge en milieu aqueux est discuté dans le chapitre 3.

Revenons maintenant aux puces à ADN. Pour une détection électronique dans le cadre des puces à ADN, on dépose d'abord des molécules sondes sur un réseau de transistors et détecte l'hybridation comme la différence entre une mesure de référence faite avant l'incubation avec les molécules cibles et une mesure faite après cette incubation<sup>2</sup>. Dans ce cas, la différence  $\Delta U_S$  correspond au changement du potentiel d'interface induit par l'hybridation sur la surface, c'est à dire une transformation de molécules sondes simple brin en molécules double brin. Les signaux  $\Delta U_S$  correspondants sont de l'ordre de quelques mV, donc typiquement plus petites que ceux observés pour l'adsorption de l'ADN.

Une difficulté de la détection électronique de l'hybridation présentée est la dérive temporelle de la caractéristique courant-tension du transistor en contact avec le milieu aqueux. A l'heure actuelle cette dérive n'est pas toujours negligable par rapport aux signaux d'hybridation, en particulier à faible concentration de molécules cibles.

### 6.3.4 Autres methodes

L'utilisation des structures FET n'est pas la seule approche possible pour une détection électronique de biomolécules, mais elle est particulièrement intéressante pour des raisons données en section 6.3.1.

Il existe aussi une approche mécanique qui consiste à mesurer le changement de masse induit par l'hybridation des molécules cibles à la surface d'un capteur mécanique sur lequel ont été préalablement greffées les sondes. La détection se fait en mesurant le décalage de la fréquence du capteur micromécanique oscillant dans le milieu liquide. Cette méthode utilise le plus souvent un cristal piezoélectrique et la surface du dispositive est de l'ordre de quelques mm<sup>2</sup>. Ce type de détection est dénommée QCM en anglais pour Quartz Crystal Microbalance. Elle est sensible, mais la surface grande constitue une limitation importante pour une application sur puces à ADN. C'est pour cette raison qu'une détection similaire a été développée sur des microleviers de plus faibles dimensions (de l'ordre du centième de mm<sup>2</sup>). Des difficultés persistent néanmoins pour une intégration à grande échelle.

Un suivi de l'hybridation sans marquage des cibles peut être réalisé aussi par une détection optique fondée sur la résonance plasmon de surface. Cette technique est dénommée SPR en anglais pour Surface Plasmon Resonance. Elle repose sur la modification de l'indice de réfraction d'une solution au voisinage d'une fine couche métallique, induite par l'appariement de molécules lors de l'hybridation. Cette méthode est, comme la fluorescence, relativement complexe. Elle ne devrait donc pas conduire à la conception de puces à haute densité, d'autant plus que les surfaces des capteurs (de l'ordre de 0.1 à 1 mm<sup>2</sup>) sont grandes

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Spatially resolved electronic detection of biopolymers, F. Pouthas et al, Phys. Rev. E 70, 31906 (2004)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Signal enhancement in electronic detection of DNA hybridization, C. Gentil et al, Phys. Rev. E 75, 11926 (2007)

devant les tailles des dépôts sur puces.

## 6.4 Conclusions du chapitre

- 1. Les puces à ADN sont basées sur une hybridation entre des molécules sondes immobilisées sur une surface et des molécules cibles en solution.
- 2. Les puces à ADN permettent une analyse parallèle d'un grand nombre d'interactions différentes. Les études de l'expressions des gènes et l'analyse des différences génomiques d'un individu à l'autre sont deux champs d'applications importants.
- 3. La surface déplace l'équilibre de l'hybridation. L'analyse de la section 6.2 prédit que la probabilité qu'une molécule sonde attachée à la surface est occupée par une molécule cible dépend de la concentration volumique des cibles, de la température, de la constante d'équilibre (et donc de la séquence) et de la différence entre les énergies de surface de la sonde et du duplex.
- 4. La détection électronique décrite est basée sur une mesure de la modification du potentiel électrostatique d'une interface entre un solide  $(SiO_2)$  et un liquide (électrolyte). Elle utilise un substrat de silicium avec un réseau de transistors intégrés à quelques nanomètres sous la surface.
- 5. La détection électronique décrite est sujet à l'écrantage des charges. Par conséquent, le signal électronique varie avec la teneur en sel de l'électrolyte.
- 6. La procedure de détection électronique décrite est sensible aux molécules chargées en général et par conséquent n'est pas limité à la détection de l'ADN ou de l'ARN.

## Chapitre 7

# Elasticité de polymères et dépliement mécanique

## Introduction

Ce chapitre est consacré aux propriétés mécaniques des biomolécules. Il est divisé en deux parties. La première partie porte sur l'élasticité de polymères modèles et est relativement classique. La deuxième concerne l'ouverture mécanique de molécules biologiques. Nous y considérons, à l'exemple des acides nucléiques soumis a une force externe, le couplage entre élasticité et depliement.

Les techniques de diffusion de rayons X et de résonance magnétique donnent la structure des ARN et des complexes entre des acides nucléiques et des protéines avec une résolution spatiale meilleure que le nanomètre. Pour comprendre les fonctions biologiques de ces molécules et complexes, il est utile de compléter cette information de structure par des études dynamiques qui donnent access aux conformations, aux paysages d'énergie et aux échelles de longueurs et de temps. La manipulation à l'échelle de la molécule unique permet d'appliquer des contraintes mécaniques (forces et couples) de façon contrôlée et de mesurer longueurs, angles ou torques en fonction du temps. Ces mesures sont typiquement fait en milieux aqueux. Elles donnent des informations précieuses sur le comportement dynamique et les propriétes élastiques des macromolécules biologiques. Il est également possible de mesurer des forces générées par un processus biologiques et d'étudier comment un tel processus dépend d'une contrainte mécanique extérieure. Pour plus d'information sur les **techniques de micromanipulation sur molécule unique** d'ADN et d'ARN et sur leurs applications aux processus biologiques, le lecteur peut consulter des revues disponibles dans la litérature <sup>1,2</sup>.

### 7.1 Elasticité de polymères

### 7.1.1 Chaîne idéale à force nulle

Les biopolymères, comme l'ADN, l'ARN et les protéines, sont des molécules élastiques. Souvent on décrit leurs conformations par le simple modèle de la chaîne librement jointe. Le polymère y est représenté par une suite de N segments rigides, chacun de longueur b. Le n<sup>me</sup> segment est noté

$$\boldsymbol{r}_n = \boldsymbol{R}_n - \boldsymbol{R}_{n-1} ,$$

où les vecteurs  $\mathbf{R}_n$  et  $\mathbf{R}_{n-1}$  correspondent à la position de chacune de ses extrémités. Dans le cadre de ce modèle, chaque segment s'oriente de manière aléatoire, isotrope, et indépendamment des autres segments. La jonction entre segments est libre, il n'y a pas de biais énergétique favorisant certains angles. Comme la distribution est isotrope nous avons pour les valeurs moyennes

$$\langle \boldsymbol{r}_n \rangle = 0$$

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Single-molecule manipulation of nucleic acids, U. Bockelmann, Curr. Opin. Struct. Biol. 14, 368 (2004)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids, T. Ha, Curr. Opin. Struct. Biol. 11, 287 (2001)

$$\langle \boldsymbol{r}_n^2 \rangle = b^2$$

Ces résultats ne dépendent pas de la dimension d de l'espace dans lequel se situe la chaîne aléatoire.

Maintenant on suppose N grand et note  $\mathbf{R} = \mathbf{R}_N - \mathbf{R}_0$  le vecteur joignant les deux extrémités de la chaîne. Pour connaître la taille du polymère nous calculons  $\bar{R} = \sqrt{\langle \mathbf{R}^2 \rangle}$ 

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = \left\langle \sum_n \sum_m \mathbf{r}_n \mathbf{r}_m \right\rangle = \sum_n \left\langle \mathbf{r}_n^2 \right\rangle + \sum_n \sum_{m \neq n} \left\langle \mathbf{r}_n \mathbf{r}_m \right\rangle = N b^2$$
  
$$\Rightarrow \bar{R} = N^{1/2} b$$

La taille de la pelote statistique augmente comme la racine carrée du nombre N de segments. Le vecteur  $\mathbf{R}$  est la somme d'un grand nombre de variables aléatoires, distribuées toutes indépendament et selon la même loi de probabilité. Par conséquent, le théorème de la limite centrale s'applique et dit que  $\mathbf{R}$  est distribué selon une Gaussienne. Nous connaissons cette Gaussienne entièrement puisque nous connaissons la valeur moyenne  $\langle \mathbf{R} \rangle = 0$  et la variance  $\langle \mathbf{R}^2 \rangle = Nb^2$ .

Quelques remarques :

- Il y a une analogie formelle entre ce modèle de la chaîne librement jointe et la description théorique du mouvement Brownien à une dimension du chapitre 4.2.1.

- L'absence d'un paramètre d'énergie caractéristique dans ce modèle implique que les résultats ne dépendent pas de la température lorsqu'on n'exerce pas de force extérieure. Considérée dans la section suivante, l'application d'une force F sur la chaîne introduit une énergie caractéristique E = Fb.

- En réalité, l'articulation entre deux maillons successifs n'est pas entièrement libre, i.e. une différence d'orientation a un coût énergétique (voir section 7.1.3).

- Dans ce modèle, rien n'interdit à deux segments de se chevaucher. En réalité, ceci est impossible, ne serait ce que pour des raisons d'encombrement stérique. Puisqu'il en résulte pour chaque segment  $r_n$  l'interdiction d'occuper certaines régions à l'intérieur de la pelote, il doit avoir une probabilité plus grande d'être à l'extérieur de la pelote. Le rayon moyen de la pelote  $\bar{R}$  est donc plus grand si on prend cette contrainte en compte, et ceci d'autant plus que N est grand. Par conséquent, on s'attend à ce que l'exposant de Flory  $\nu$  (où  $\bar{R} \propto N^{\nu}$ ) soit supérieur à la valeur de la pelote gaussienne  $\nu = 1/2$ . Pour une marche aléatoire à deux dimensions avec volume exclu, par exemple, on s'attend à un exposant de Flory de  $\nu = 3/4$ . Cette valeur a été confirmé par imagerie en fluorescence sur des molécules d'ADN fixées électrostatiquement sur une bicouche lipidique fluide<sup>3</sup>.

### 7.1.2 Chaînes idéales soumises à une force de traction

On soumet maintenant les deux extrémités de la chaîne à une force de traction  $\mathbf{F} = F \boldsymbol{u}_{\boldsymbol{z}}$  et cherche à déterminer la longueur moyenne  $L = |\langle \boldsymbol{R} \rangle|$  du polymère. Pour l'instant ce dernier est toujours représentée comme une succession de N segments rigides de longueur constante b. Compte tenu de la force, l'orientation des segments n'est plus isotrope. En utilisant la distribution canonique de Boltzmann, on écrit la probabilité  $d^2P$  de trouver le segment  $\boldsymbol{r}_n$  orienté à l'intérieur d'un angle solide  $d^2\Omega$  et en déduit

$$\frac{L}{L_0} = \alpha \left(\frac{Fb}{k_B T}\right) \tag{7.1}$$

où  $L_0 = Nb$  est la longueur de la molécule complètement étirée et  $\alpha(x)$  est la fonction de Langevin

$$\alpha(x) = \coth(x) - \frac{1}{x}$$

On note que  $L/L_0$  se comporte, à petite force, comme

$$\frac{L}{L_0} \cong \frac{1}{3} \frac{Fb}{k_B T}$$

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Conformation and Self-Diffusion of Single DNA Molecules Confined to Two Dimensions, B. Maier and J. O. Rädler, Phys. Rev. Lett. 82, 1911 (1999)

et, à grande force, comme

$$\frac{L}{L_0} \cong 1 - \frac{k_B T}{F b} \,.$$

Le modèle prédit qu'à faible force l'élasticité de la molécule suit la loi de Hooke F = Kz, comme un ressort linéaire. La raideur correspondante

$$K = \frac{3k_BT}{Nb^2}$$

augmente linéairement avec la température et est inversement proportionel à la longueur du polymère.

Pour des forces inférieures de  $\sim 1$  pN, et pourvu que le polymère ne présente pas de structures sécondaires significatives, ce modèle de maillons indépendants (freely jointed chain, FJC) décrit bien la courbe force/extension mesurée sur les acides nucléiques individuelles. Pour des forces plus grandes, on peut améliorer l'accord entre théorie et expérience en tenant compte du fait que l'articulation entre deux maillons successives n'est pas entièrement libre (voir section suivante).

### 7.1.3 Chaîne avec corrélations

Maintenant nous introduisons dans la description théorique le fait que l'articulation entre deux maillons successifs n'est pas entièrement libre, i.e. une différence d'orientation a un coût énergétique. On definit la fonction de corrélation

$$\langle \boldsymbol{r}_i \cdot \boldsymbol{r}_j \rangle_0 = b^2 \exp\left(-\frac{|j-i|b}{l_p}\right).$$

La valeur moyenne  $\langle ... \rangle_0$  est prise à force nulle. La longueur de persistance  $l_p$  caractérise l'étendue spatiale des corrélations. Deux points de la chaîne distants de moins de  $l_p$  ont des orientations voisines, alors que lorsque la distance est grande devant  $l_p$ , leurs orientations sont des variables relativement indépendantes. A faible force on retrouve la loi de Hooke, avec

$$K = \frac{3k_BT}{2l_pNb} \,.$$

La longueur de persistence  $l_p$  est de l'ordre de 50 nm pour l'ADN double brin en milieu salin physiologique. Côté protéines, on caractérise l'élasticité de filaments formés par l'assemblage de protéines aussi par la longueur de persistance (voir chapitre 8). Nous avons  $l_p \simeq 5$  mm pour une microtubule et  $l_p \simeq 15$  $\mu$ m pour le filament d'actine.

Ce modèle décrit l'élasticité de l'ADN pour des forces modérées. Pour des forces plus grandes (audessus d'environ 20 pN) il faut introduire un module élastique (b s'allonge linéairement sous effet de la force). Dans ce modèle, l'élasticité du polymère a une partie entropique et enthalpique.

La réponse élastique des protéines globulaires est plus compliquée à cause des structures sécondaires et tertiaires induites par de diverses interactions intramoléculaires et les couplages associés entre l'élasticité et le dépliement des motifs. Dans la section suivante nous approchons cette situation, avec deux cas modèles simples qui font intervenir l'ouverture mécanique de séquences de bases complémentaires dans l'ADN et dans l'ARN.

## 7.2 Dépliement mécanique

### 7.2.1 Ouverture de l'ADN

Il est possible d'ouvrir la double hélice de l'ADN comme une fermeture éclair en tirant sur chacun des brins par micromanipulation directe et de mesurer les forces d'interactions entre les deux brins complémentaires. Comme l'énergie d'interaction dépend du type de paire de base (voir chapitre 5), cette configuration de mesure permet d'obtenir un signal de force qui depend de la séquence de l'ADN. Une description détaillée de ces expériences est donnée dans la literature <sup>4</sup>.

 $<sup>^{4}</sup>$ Unzipping DNA with optical tweezers : high sequence sensitivity and force flips, U. Bockelmann et al, Biophys. J. 82, 1537 (2002)

La préparation de ces mesures fait intervenir une combinaison de techniques de chimie de surface, biologie moléculaire et de nanomanipulation physique. Une difficulté centrale est d'arriver à attacher les deux brins d'une molécule isolée séparément sur deux surfaces solides qui serviront de "poignées" pour induire et contrôler l'ouverture. A cette fin, une "construction moléculaire" particulière est préparée. Partant d'un morceau d'ADN à ouvrir, un des brins est rallongé d'une dizaine de micromètres avec un autre morceau d'ADN et attaché à une lamelle de verre. L'autre brin a été préparé pour s'attacher de façon spécifique sur une bille de quelques micromètres de diamètre (figure 7.1).

La mesure est conduite dans un petit volume de liquide, sur une lamelle de verre. L'échantillon est placé sur un microscope, relié à une caméra qui permet une acquisition vidéo de la position de la bille. Cette configuration permet de séparer mécaniquement les deux brins et de mesurer la force qui s'y oppose. En tirant sur un brin et maintenant l'autre brin fixe, une force de cisaillement entre les deux brins est provoquée et va conduire à l'ouverture de la double hélice.

Dans une première configuration une sorte de "canne à pêche" microscopique est utilisée, constituée d'une micro-fibre de verre, à l'extrémité de laquelle adhère une bille (par interaction biotine/streptavidine). La lamelle est ensuite déplacé lentement de façon latérale et on observe la pointe de la canne : sa déflexion est mesurée et indique quelle force est exercée. En fonction d'un déplacement progressif et lent imposé, un profil de force d'ouverture est obtenu (figure 7.2). Ces forces sont de l'ordre de 10-15 pN. La longueur de l'ADN à ouvrir est ici d'environ 16  $\mu$ m (ADN du bactériophage  $\lambda$  avec 48502 paires de bases). Le signal de force présente des successions de pics et de vallées et la mesure est reproductible : on peut revenir lentement à la position de départ (ce qui provoque la re-fermeture de la molécule) et imposer un nouveau cycle d'ouverture. Si une autre construction moléculaire est réalisée, de façon à ouvrir la molécule par l'autre extrémité, un signal de force est obtenu dont les caractéristiques générales apparaissent en ordre inverse. Le signal mesuré est donc lié à la séquence. La force est plus grande lorsque la fourche d'ouverture se trouve dans une région riche en paires G-C et plus petite lorsqu'elle se trouve dans une région riche en A-T.

Une analyse physique détaillée du signal de force lors de l'ouverture montre que la séparation des brins ne se produit pas de manière regulière mais comporte une série de cycles d'adhésion-rupture ou "stickslip". Par opposition aux instabilités mécaniques de frottement macroscopique, le stick-slip moléculaire observé ici est reproductible. Il est determiné par la séquence des bases et les raideurs mécaniques du système de mesure et des brins d'ADN. Une description théorique, reposant sur le modèle de l'interaction entre séquences complémentaires developpé dans le chapitre 5 et sur l'hypothèse d'un équilibre thermodynamique local, reproduit bien les courbes expérimentales pour des vitesses de déplacement inférieures à 1  $\mu$ m/s.

L'ouverture mécanique a ensuite été effectuée avec un piège optique qui donne une résolution de position de la bille de l'ordre du nanomètre, et travaille avec une raideur mécanique de l'ordre de 100 pN/ $\mu$ m, soit près de deux ordres de grandeurs plus raide que le système de microfibre utilisé précédemment (figure 7.1b). Le piège optique offre à la fois une sensibilité beaucoup plus fine sur la séquence de l'ADN et une résolution temporelle de quelques ms. La comparaison directe des donnés du piège optique et celles de la micro-fibre de verre présentée sur la figure 7.3 illustre ce gain de sensibilité. Le piège optique permet d'étudier la dynamique de l'ouverture et de refermeture sur de très petites échelles (nanomètre à dizaine de nanomètres) et sur une grande gamme de vitesse de déplacement (0-20  $\mu$ m/s).

L'expérience d'ouverture mécanique aide à obtenir une compréhension plus fine des interactions qui stabilisent la double hélice et il représente potentiellement une nouvelle méthode pour l'analyse des séquences d'ADN génomique. La comparaison entre les résultats expérimentaux et théoriques indique que la mesure de force a une sensibilité très locale à la séquence génomique de l'ADN. Dans certains cas, le changement d'une seule paire de base peut supprimer un évènement dans la courbe théorique qui apparait dans la courbe mesurée avec le piège optique.

Pour des vitesses de déplacement supérieures à 1  $\mu$ m/s la sensibilité par rapport à la séquence de bases diminue et des phénomènes hors équilibre interviennent. Ouvrant une molécule d'ADN avec différentes vitesses v, la force moyenne mesurée augmente avec v. A vitesse donnée, cette augmentation diminue lors de l'ouverture progressive d'une longue molécule d'ADN. Comme la partie double brin diminue lorsque l'ouverture progresse, l'augmentation de la force avec la vitesse est attribuée à la friction visqueuse causée par la rotation de la double hélice. L'ouverture mécanique peut ainsi servir pour étudier expérimentalement la friction rotationelle de l'ADN en milieu aqueux.



Figure 7.1. (a) Schéma simplifié de l'échantillon, placé sur un microscope. L'ADN à ouvrir est attaché par chacune de ses extrémités, d'une part à une petite bille et d'autre part à un bras espaceur (brin d'ADN). La mesure est faite par une micro-fibre de verre que l'on colle à la bille. On déplace progressivement la lamelle (vers la gauche sur ce schéma), ce qui provoque la séparation progressive des brins. Les forces correspondant à l'ouverture de la molécule sont mesurées grâce à la déflexion de la micro-fibre. (b) Pour les mesures à plus haute résolution, la micro-fibre est remplacé par un piège optique avec mesure interférométrique de la position de la bille.



**Figure 7.2.** Opening DNA with a soft glass micro-needle. Force (deflection of the calibrated needle) as a function of the end to end distance, measured while pulling the molecular construction with a displacement velocity of 200 nm/s. The end to end distance is defined as the difference between the imposed displacement and the lever deflection. At the origin (0  $\mu$ m) the needle is positioned directly above the anchoring point of the DNA on the glass slide. A displacement in positive or negative direction leads to a symmetrical deflection of the needle, shown as a positive force, respectively negative force. Bockelmann et al, C. R. Physique 3, 585 (2002).



Figure 7.3. Signal de force correspondant à l'ouverture mécanique des premières 3300 paires de bases d'une molécule de  $\lambda$  DNA. Sur la même séquence de l'ADN, la mesure par piège optique (en bas) donne beaucoup plus de détail que la mesure par micro-fibre de verre (au milieu). Cette différence est due au fait que la raideur du piège est 100 fois supérieure à celle de la micro-fibre utilisée. Les mesures sont assez bien reproduites par un calcul basé sur l'hypothèse d'un équilibre thermodynamique. La valeur moyenne  $\langle j \rangle$  du nombre de paires de bases ouvertes calculée est presentée en haut. On observe que l'avancement de la fourche d'ouverture avec le déplacement n'est pas regulière. Ceci est dû au stick-slip moléculaire, l'effet est plus important à faible raideur (courbe grise correspondant à la fibre de verre). Bockelmann et al, Biophys. J. 82, 1537 (2002).



Figure 7.4 (gauche). Molécule d'ARN capable à former une structure de type épingle à cheveux. Figure 7.5 (droite). Extension en fonction de la force. Courbe noir : construction moléculaire avec la séquence de fig.7.4. Courbe grise : construction de contrôle avec une séquence qui ne forme pas d'épingle à cheveux. Liphardt et al, 2001.

Un résultat inattendu de l'ouverture de l'ADN avec piège optique a été l'observation de sauts discrets de force entre deux (ou plusieurs) valeurs distinctes, avec et sans déplacement imposé. Ces sauts correspondent à des transitions spontanées entre différentes états moléculaires. La molécule partiellement ouverte bascule entre des états quasi-dégénérés séparés par des barrières énergétiques de quelques  $k_BT$ , les états de force supérieure avec moins de paires de bases ouvertes et les états de force inférieure avec plus de paires ouvertes. Ces mesures directes des fluctuations moléculaires donnent des perspectives particulièrement intéressantes pour étudier la dynamique de repliement des molécules d'ARN et leur interaction avec des enzymes. Nous en discutons un exemple dans le paragraphe suivant.

# 7.2.2 Transitions spontanées entre états ouvert et fermé dans une épingle à cheveux d'ARN

Dans cette section nous considérons une molécule d'ARN simple, capable de se réplier sur elle même en formant une hélice avec une succession de bases appariées (figure 7.4). Les mesures correspondants ont été effectuées par l'équipe de Carlos Bustamante  $^{5}$ .

Si on saisit cette molécule par ses extrémités 5' et 3' et applique une force de traction lentement croissante, la longueur du polymère augmente d'une façon discontinue avec la force (figure 7.5). La courbe noire montre une discontinuité due au déroulement de l'hélice au voisinage de 15 pN, les autres parties de la courbe force/extension correspondent à la réponse élastique des parties moléculaires qui lient l'hélice à des points d'ancrage sur deux billes micrométriques. L'expérience se déroule à l'échelle de la molécule unique, en milieu aqueux. La force est appliquée aux billes avec un dispositif de double piège optique. La courbe grise a été obtenue sur une séquence qui ne forme pas d'hélice et montre une réponse purement élastique.

Au voisinage de 15 pN le système montre des transitions spontanées entre deux états, épingle ouverte et épingle fermée. L'équilibre entre les deux états dépend de la force : à faible force la molécule est plus souvent fermée, et à grand force elle est plus souvent ouverte (figure 7.6). Comme pour l'ouverture de l'ADN, la mesure sur molécule unique permet ici de suivre l'évolution temporelle du système.

Nous faisons maintenant une analyse simple de la dynamique de ce système à deux états. Elle fait intervenir deux taux de transition,  $k_{-}$  pour la transition de l'état fermé (état 1) à l'état ouvert (état 2) et  $k_{+}$  pour la transition  $2 \rightarrow 1$ . Les taux  $k_{+}$ ,  $k_{-}$  dépendent de la force F appliquée. Supposons que le système se trouve dans l'état 1 à t = 0 et cherchons la probabilité qu'il y reste pendant un temps t et bascule dans l'état 2 pendant l'interval [t, t + dt]. La probabilité P(t) de survie dans l'état 1 est donné

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force, J. Liphardt et al, Science 292, 733 (2001).



**Figure 7.6.** Longueur en fonction du temps de la molécule d'ARN à épingle à cheveux, pour différentes valeurs de force imposée (6 tracés les uns au-dessus des autres). Liphardt et al, 2001.



**Figure 7.7.** Histograms des temps d'attente avant une transition  $1 \rightarrow 2$  (bas) et  $2 \rightarrow 1$  (haut) pour deux valeurs différentes de force. L'ajustement des courbes de haut (par équation 7.3) donne  $k_{+} = 1.5s^{-1}$  à 14.4 pN et  $k_{+} = 8.5s^{-1}$  à 13.7 pN. L'ajustement des courbes de bas (par équation 7.2) donne  $k_{-} = 7.0s^{-1}$  à 14.4 pN et  $k_{-} = 0.9s^{-1}$  à 13.7 pN. Liphardt et al, 2001.

 $\operatorname{par}$ 

$$P(t) = e^{-k_- t} \, .$$

La probabilité de transition recherchée s'écrit donc

$$P_{1\to 2} = dt k_{-} e^{-k_{-}t} . (7.2)$$

Pour un système préparé dans l'état 2 nous avons par symétrie,

$$P_{2\to 1} = dtk_+ \ e^{-k_+t} \ . \tag{7.3}$$

Les deux probabilités  $P_{1\to 2}$  et  $P_{2\to 1}$  peuvent être extraits d'une mesure de type figure 7.6. Le résultat est montré sur la figure 7.7, pour deux valeurs différentes de force. A petite force la molécule reste peu de temps dans l'état ouvert et longtemps dans l'état fermé. A grande force le résultat inverse est observé. Les valeurs de fits correspondant aux lignes continues sont données dans la légende.

## 7.3 Conclusions du chapitre

- 1. La taille de la pelote statistique d'une chaîne idéale à force nulle augmente comme la racine carrée du nombre N de segments.
- 2. Pour des forces faibles et pourvu que le polymère ne présente pas de structures sécondaires significatives, le modèle de maillons indépendants décrit bien la courbe force/extension mesurée sur les acides nucléiques individuelles.
- 3. Le modèle de chaîne avec corrélations décrit bien l'élasticité de l'ADN pour des forces modérées.
- 4. La manipulation à l'échelle de la molécule unique permet d'appliquer en milieux aqueux des contraintes mécaniques (forces et couples) et de mesurer longueurs, angles ou torques en fonction du temps.
- 5. L'expérience d'ouverture mécanique de la double hélice a une sensibilité à la séquence de l'ADN.
- 6. La mesure sur molécule unique avec résolution temporelle donne accès à la dynamique de la molécule et permet de déterminer les taux des transitions intramoléculaires en fonction de la force.

## Chapitre 8

## Filaments du cytosquelette

## 8.1 Cytosquelette : une armature dynamique

La représentation classique d'une cellule est celle d'une poche contenant en son sein d'autres poches (membranes) et objets baignant de façon plus ou moins fluide dans le cytoplasme. De fait, une représentation plus juste doit inclure les nombreux filaments présents ainsi que les réseaux et assemblages qu'ils forment au sein de la cellule. Leurs propriétés mécaniques et dynamiques sont essentielles pour des fonctions de base de la cellule (locomotion, division, adhésion, information) et directement à l'oeuvre chez les organismes supérieurs (muscles, audition, reproduction). Ces structures linéaires relativement rigides sont fabriquées par la cellule elle-même, par assemblage de petites protéines. On regroupe l'ensemble des filaments et des structures qu'ils forment par assemblage sous le nom de *cytosquelette*, et trois grandes familles sont habituellement distinguées : les filaments d'actine, les microtubules, et les filaments intermédiaires.

Nous commencerons par une description de propriétés génériques de ces filaments, avant de détailler plus précisément les spécificités des différentes familles. Nous présenterons ensuite diverses méthodes physiques utilisées pour caractériser directement ces filaments.

Nous nous tournerons ensuite vers ce qui fait la spécificité de ces filaments (par opposition par exemple à de petites fibres artificelles), à savoir leur dynamique d'assemblage et désassemblage qui est contrôlée par la physico-chimie de l'environnement. Ceci permet dans des situations hors d'équilibre d'avoir des couplages mécano-chimiques largement utilisés à l'échelle cellulaire, par exemple pour l'organisation spatiale interne de la cellule, où pour son déplacement dans certains cas.

## 8.2 Propriétés génériques des filaments du cytosquelette

### 8.2.1 Assemblage

Il est tout à fait remarquable que la cellule parvienne à produire des objets rigides, les filaments, de quelques microns de longueur, à partir de protéines de quelques nanomètres de taille. Ceci est d'autant plus notable que cette association est réversible, et que la cellule peut défaire et refaire des filaments de nombreuses fois en utilisant les mêmes protéines. Ceci suppose des interactions entre protéines directionnelles (pour que se forment des filaments et non des amas informes). De plus ces interactions doivent être assez fortes pour que les filaments résistent à différentes sollicitations modérées (et en particulier l'agitation thermique), mais assez faibles pour permettre le désassemblage. Typiquement, ceci conduit à des interactions de plusieurs  $k_BT$ , souvent renforcées par des effets coopératifs entre protéines d'un même filament.

De fait, l'assemblage et le désassemblage sont en général pilotés in vivo par des mécanismes hors d'équilibre qui permettent à la cellule de réguler les fonctions associées. La dynamique est principalement dominée par les extrémités qui croissent ou décroissent suivant les situations. Typiquement il existe des agents activateurs ou inhibiteurs, pour la croissance et la décroissance, dont la concentration locale conditionne la dynamique d'assemblage. Par exemple, certaines protéines peuvent couvrir l'extrémité des filaments et ainsi figer la dynamique correspondante.

Par ailleurs de nombreuses protéines permettent un niveau de régulation supplémentaire. Certaines permettent la formation d'un "gel" en liant physiquement (en "réticulant") les filaments les uns aux autres, ce qui résulte en un réseau mécaniquement rigide. L'organisation peut en être désordonnée et lâche, ou au contraire sous forme de fibres ou faisceaux de filaments presque parallèles et reliés les uns aux autres. D'autres protéines permettent la dissolution rapide d'un réseau ou d'une assemblée de filaments en "coupant" les filaments tout au long de leur structure. Enfin, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, des complexes à base de moteurs moléculaires permettent de déplacer des filaments les uns par rapport aux autres, et d'arriver ainsi à des structures spatiales originales.

### 8.2.2 Rigidité mécanique : constante de courbure et longueur de persistance

Elasticité de courbure - Une propriété importante des filaments est leur rigidité mécanique. Pour des objets linéaires (comme un barreau en mécanique), il est classique de caractériser celle-ci par une constante de courbure K, définie comme suit : un barreau de longueur L courbé avec une courbure c (ou un rayon de courbure R = 1/c), stocke une énergie élastique  $E_{el} = \frac{1}{2}Kc^2.L$ .

Pour un cylindre de rayon a constitué d'un matériau élastique isotrope de module élastique G, une analyse simple montre que  $K \sim Ga^4$  comme nous allons le voir. De façon générale, la densité locale d'énergie élastique dans un solide déformé est d'ordre  $Ge^2$ , où e est le taux de déformation local. Pour le barreau courbé, l'énergie élastique provient essentiellement de la compression du matériau du côté intérieur de la courbure et de l'extension du matériau à l'extérieur. Plus quantitativement, courber le barreau avec un rayon R allonge le contour extérieur de L à L(R + a)/R, et rétrécit le contour intérieur à L(R-a)/R. On voit ainsi que les taux de déformation sont d'ordre a/R. Donc pour le barreau courbé, la densité d'énergie élastique est d'ordre  $G(a/R)^2$ , ce qui pour l'ensemble du barreau de volume  $\pi a^2 L$ conduit à  $E_{el} \sim Ga^4 c^2 L$  et donc  $K \sim Ga^4$  avec un préfacteur qui dépend de la géométrie exacte de la section du barreau.

Pour un objet de section ou de structure locale plus complexe on peut en principe avoir des constantes de courbure différentes suivant les directions de courbure. Dans certaines situations il faut également tenir compte de la torsion du barreau, à laquelle correspond une autre constante élastique. Nous négligerons ici ces aspects.

Pour un filament de longueur L dont la courbure n'est pas homogène, on peut décrire sa conformation par une trajectoire  $\mathbf{r}(s)$  où l'abscisse curvilinéaire s varie de 0 à L, et l'énergie élastique associée à cette configuration est simplement la somme de celle de chacune des parties de courbure locale  $d^2\mathbf{r}/ds^2$ , soit pour le filament entier  $E_{el} = \int_0^L \frac{1}{2} K (d^2\mathbf{r}/ds^2)^2 ds$ .

Longueur de persistance - Un concept utile lorsque l'on veut comparer les effets élastiques à ceux de l'agitation thermique est celui de longueur de persistance. On définit cette longueur de persistance comme  $l_p = K/k_BT$  (vérifiez que c'est dimensionellement correct). La signification physique de cette longueur est la suivante : sous l'effet de l'agitation thermique, la courbure moyenne d'un morceau de filament de longueur l est donné par  $E_{el} = \frac{1}{2}Kc^2 l \simeq \frac{1}{2}k_BT$ , d'où une courbure typique  $c \sim (ll_p)^{-1/2}$ . Pour un filament de longueur totale  $L < l_p$ , cette courbure est donc petite au sens où le rayon de courbure est sensiblement plus grand que L, le filament est presque droit. Pour un filament (nous verrons un peu plus loin une description plus précise de la déformation d'un filament sous l'effet de l'agitation thermique). De sorte, le filament apparaît très ondulé, avec ses deux extrémités pointant dans des directions essentiellement décorrélées.  $l_p$  est en fait la longueur de mémoire de l'orientation du filament. Des filaments beaucoup plus longs que  $l_p$  apparaissent comme des pelotes (cas que l'on a vu pour l'ADN par exemple, pour lequel  $l_p$  est d'ordre de 50 nm). Pour nombre de filaments du cytosquelette, la longueur de persistence est comparable ou plus grande que les dimensions de la cellule, et on est en général dans le régime  $L \leq l_p$  de filaments modérément déformés par rapport à leur configuration rectiligne de base.

Faisceaux - Les filaments sont parfois organisés en faisceaux, constituant des fibres ou super-filaments à plus grande échelle. Ces fibres sont également caractérisées par une constante de courbure  $K_{fibre}$ . Si les N filaments qui la constituent peuvent coulisser librement les uns par rapport aux autres, alors on a simplement  $K_{fibre} = NK_{filaments}$ . Mais s'ils sont attachés les uns aux autres latéralement, la rigidité croît notablement. Ainsi pour un assemblage de N filaments de rayon a en une fibre cylindrique de rayon  $\rho \sim N^{1/2}a$ , cet attachement latéral conduit à  $K_{fibre} \sim N^2 K_{filament}$ ! En effet pour une déformation conduisant à un rayon de courbure R, le taux de compression ou d'extension typique des filaments est maintenant  $\rho/R$ , ce qui conduit au résultat annoncé. La physique correspondante est claire : il est plus difficile de courber un annuaire si vous en avez collé les pages les unes aux autres. En assemblant des filaments en fibres, la cellule génère ainsi des objets beaucoup plus rigides!

### 8.3 Filaments : les trois grandes familles

### 8.3.1 Actine

Un filament constitué de protéines. Les filaments d'actine (la F-actine) est formée par l'assemblage suivant deux brins enroulés en hélice de protéines globulaires identiques, protéine appelée la G-actine. Cette protéine globulaire a une taille d'environ 5.5 nm, et une masse d'environ 45 kDaltons. Elle présente en son sein une "poche" dans laquelle elle peut fixer une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et un ion divalent  $Mg^{2+}$ . C'est sous cette forme qu'elle s'assemble préférentiellement en filament, et la présence d'ATP influe donc fortement sur la formation des filaments. Le filament en hélice résultant a lui un diamètre d'environ 6 nm, et un pas de 72 nm.

Un filament chiral et polaire. Cette hélice consiste en l'enroulement l'un autour de l'autre de deux protofilaments polaires : au sein de chaque protofilament les G-actine s'associent tête-à-queue toujours dans le même sens de sorte que les deux extrémités des protofilaments sont différentes. Ceci reste vrai pour le filament total, car les deux protofilaments "pointent" dans la même direction. On parle pour le filament entier de son extrémité + (ou bout "barbé", anglicisme pour "barbed end"), et de son extrémité - (ou bout pointu), ces noms provenant de caractérisation morphologiques d'après des images par microscopie électronique.

Un filament assez rigide. La longueur de persistence des filaments d'actine est d'ordre  $l_p \sim 10 \ \mu m$ , tout à fait comparable aux dimensions d'une cellule.

### 8.3.2 Microtubules

Un filament tubulaire formé de dimères de protéines. Les microtubules sont des filaments plus rigides, dont la structure et la formation sont plus complexes que celles des filaments d'actine. Les éléments de base sont deux protéines globulaires assez proches, la tubuline  $\alpha$  et la tubuline  $\beta$ , dont la taille est de quelques microns. Ces deux protéines s'assemblent en dimères  $\alpha - \beta$ , polaires, de longueur 8 nm et de masse 50 kDa. Chacun de ces dimères possède une poche à GTP (Guanosine TriPhosphate). Ces dimères s'assemblent en structures linéaires et polaires, les protofilaments. Ces derniers s'assemblent eux-mêmes pour former un tube creux dont les parois sont composées de treize (le plus souvent) protofilaments parallèles entre eux. C'est ce tube de diamètre extérieur 25 nm que l'on appelle microtubule. De façon remarquable ce tube est creux avec un grand diamètre intérieur de 14 nm.

Un filament chiral et polaire. La structure est en fait encore plus élaborée, car le motif des  $\alpha$  (et des  $\beta$ ) s'enroule hélicoidalement autour du tube. Deux protofilaments voisins sont décalés dans leur motifs d'environ 0.92 nm, de sorte qu'après 13 filaments, le décalage est de  $13 \times 0.92 = 12$  nm, soit exactement trois monomères. En plus de cette structure en hélice, le filament est polaire car les protofilaments le sont et s'assemblent en pointant dans la même direction. Le résultat est donc un filament polaire et chiral. On parle également d'extrémités - et + pour désigner les deux types d'extrémités. Dans la cellule, on a majoritairement des structures avec des microtubules pointant du centre (noyau ou centrosome) vers l'extérieur, avec l'extrémité - au centre.

Note : des microtubules avec d'autres nombres de protofilaments (entre 8 et 19) sont parfois observés. Pour assurer la régularité des décalages entre protofilaments, ceux-ci ne restent pas parallèles à l'axe du tubule, mais s'enroulent autour de lui en hélice (pas +4.5  $\mu$ m pour 12 protofilaments, -5.8  $\mu$ m pour 14 protofilaments) Un filament très rigide. Pour des raisons comparables à ce que nous avons évoqué pour les fibres, les microtubules sont très rigides (parce que les protofilaments sont latéralement liés les uns aux autres), avec des longueurs de persistance de plusieurs millimètres!

### 8.3.3 Filaments intermédiaires

L'appellation "filaments intermédiaires" regroupe un ensemble plus hétérogène de filaments, qui ont en commun les propriétés suivantes : leur diamètre est d'ordre 8 à 12 nm, ils ne sont pas polaires, ils sont souvent organisés en réseaux. Leur rigidité est comparable à celle des filaments d'actine ou plus faible.

Parmi les filaments intermédiaires les plus courants, citons les filaments de kératine (présents dans la peau et les cheveux), ceux de vimentine (présents dans les muscles et impliqués dans la contraction), les neurofilaments (impliqués dans les neurones).

Leur assemblage s'effectue en général par association des protéines de départ sous forme de dimères (par formation d'une hélice  $\alpha$  entre les deux "queues" des monomères), puis par assemblage tête-bêche de ces dimères en tetramères (on perd toute polarité à ce niveau), et ensuite assemblage des tetramères en protofilaments, assemblage des protofilaments en filaments, et assemblage des filaments en réseaux.

### 8.3.4 Un commentaire : auto-assemblage et approche bottom-up

Nous venons de passer en revue plusieurs exemples d'assemblage "bottom-up", où de petits éléments s'organisent spontanément en structures élaborées et fonctionnelles plus grandes, si on les met dans des conditions idoines. Cette philosophie guide nombre de travaux de recherche en nanotechnologie : au lieu de micro-usiner/découper/fabriquer des objets sophistiqués (approche "top-down"), on peut chercher à synthétiser de petits éléments de bases dans lesquels on aurait codé/imprimé des structures les amenant à s'auto-assembler pour réaliser la structure recherchée. L'auto-assemblage des lipides en membranes bicouches est un autre exemple.

Le codage des protéines est un outil remarquablement puissant en ce sens, dont nombre de chercheurs essaient de comprendre la logique : codage de la séquence primaire -> structure tertiaire -> propriétés d'assemblage.

### 8.4 Détermination expérimentale de la rigidité des filaments

Comment peut-on déterminer expérimentalement la rigidité des filaments ou de leurs assemblages? Un première approche consiste à appliquer des contraintes mécaniques sur une structure in vivo et d'en déterminer ainsi les propriétés élastiques. Différentes méthodes de micromanipulation sont envisageables suivant la rigidité de l'objet : micropipettes, pinces optiques ou magnétiques... Ceci a par exemple été effectué sur un cil de spermatozoide (l'appendice qui lui permet de se mouvoir), en conduisant à une valeur de  $l_p$  d'ordre 15 cm pour le cil entier. Pour en déduire quelque chose quant aux microtubules qui en constituent l'armature, il faut alors un modèle quant à la structure de cet objet. Des observations (microscopie électronique) indiquent la présence de 9 doublets de microtubules et de deux microtubules simples. Par un modèle de cette structure, on peut montrer que la valeur de  $l_p$  observée pour le cil est compatible avec des longueurs de persistance de quelques millimètres par microtubule, mais le passage par le modèle rend la mesure indirecte. Cette conclusion s'applique à nombre de mesures sur des assemblages de filaments in vivo.

De fait pour l'actine et les microtubules, différentes méthodes de purification des protéines existent, ce qui permet de réaliser l'assemblage des filaments in vitro et de déterminer ainsi directement les propriétés mécaniques d'un filament seul. Nous décrivons ci-dessous deux exemples.

#### Fluctuations thermiques spontanées

Une première méthode remonte à la définition même de la longueur de persistance, et consiste à observer le résultat de la compétition entre agitation thermique et élasticité. Plus précisément, l'élasticité représente la partie enthalpique par laquelle le filament préfère rester droit, alors que d'un point de

vue entropique il est préférable d'explorer d'autres configurations (i.e. que ces dernières aient un poids statistique non nul).

Une expérience consiste à observer (par exemple par microscopie de fluorescence) un filament confiné entre deux plaques proches l'une de l'autre (typiquement lame de verre et lamelle). On peut alors digitaliser les images obtenues, et obtenir ainsi la statistique des configurations bidimensionnelles adoptées par le filament.

Chacune d'entre elles peut être décrite par l'angle  $\theta(s)$  que fait le filament avec une direction donnée à l'abscisse s (s entre 0 et L longueur du filament). Comme la courbure locale est  $d\theta/ds$ , en reprenant les équations du paragraphe 8.2.2, on voit que l'énergie associée à chaque configuration est  $E_{elast} = \int_0^L \frac{1}{2}k_BTl_p(d\theta/ds)^2 ds$ . Celle-ci peut-être simplifiée en décomposant en modes propres  $\theta(s) = \sum_n a_n \cos(\frac{n\pi s}{L})$  (si les deux extrémités sont libres, l'absence de couples sur ces points impose que seuls les cosinus restent), avec  $a_n$  l'amplitude du mode n. L'énergie élastique est alors  $E_{elast} = L(\frac{1}{2}k_BTl_p)(\frac{n\pi}{L})^2\frac{1}{2}a_n^2$ . En écrivant l'équipartition de l'énérgie (pour cette partie potentielle de l'énergie, on ne décrit pas ici les termes d'énergie cinétique), l'énergie moyenne pour chaque mode est  $\frac{1}{2}k_BT$ , et on obtient l'amplitude moyenne des fluctuations thermiques spontanées pour chacun de ces modes :  $\langle a_n^2 \rangle = \frac{2}{(n\pi)^2} \cdot (L/l_p)$ .

En revenant aux expériences, on peut donc faire l'analyse de Fourier des configurations  $\theta(s)$  observées, et tracer  $\langle a_n^2 \rangle$  en fonction de  $n^{-2}$ . Une droite est effectivement obtenue, ce qui confirme la validité de l'analyse théorique. De la valeur de la pente on peut alors déduire  $l_p$ . Ce type de méthode a été utilisée pour les microtubules (résultat  $l_p \simeq 5$  mm) et la F-actine (résultat  $l_p \simeq 15 \ \mu$ m).

#### Agitation mécanique d'un filament

Une autre solution consiste à observer la réponse mécanique du filament à une contrainte imposée. On peut essayer de le saisir en deux points et ainsi le déformer de façon statique, ou ne le saisir que par un point et observer sa réponse dynamique lorsque l'on déplace le point d'attache. Une expérience suivant le deuxième mode consiste à attacher un filament d'actine à une bille colloïdale par une de ces extrémités, et à manipuler cette bille au moyen d'un piège magnétique. Une procédure simple consiste alors à imposer une oscillation périodique, d'amplitude a et de fréquence  $\omega$  au piège qui entraine la bille. Ceci résulte en une déformation oscillante du filament qui s'atténue progressivement lorsque l'on s'éloigne de l'extrémité agitée, et qui présente des noeuds et des ventres avec un espacement caractéristique qui dépend de  $\omega$ . Ce comportement résulte de l'action combinée des forces élastiques et visqueuses.

Essayons de construire une petite théorie linéaire à deux dimensions, avec de petites déformations u(x,t) du filament (autour de la configuration droite de référence y(x) = 0), soit y = u(x,t) pour x entre 0 et L. Le mouvement imposé à l'extrémité correspond alors à  $u(0,t) = ae^{i\omega t}$ . Pour une telle structure la courbure locale est  $c(x,t) \simeq d^2 u/dx^2$ . La somme des forces sur un petit segment du filament de longueur  $\delta x$  est alors, en ajoutant la force élastique et la force de frottement visqueux sur le fluide environnant,  $-K \frac{d^4u}{dx^4} \delta x - \xi \frac{du}{dt} \delta x$ , où  $\xi$  est un coefficient de friction par unité de longueur pour le filament. A cette échelle, l'inertie est négligeable, de sorte que cette force doit être nulle. On peut résoudre l'équation correspondante sous la forme  $u(x,t) = ae^{i\omega t} f(x)$ . Par simple analyse dimensionnelle on voit toutefois sans calcul qu'une longueur caractéristique  $l(\omega) = (K/\xi\omega)^{1/4}$  apparaît naturellement dans f(x), qui est directement reliée à la distance entre les noeuds dans les oscillations.

Expérimentalement la loi en  $l \sim \omega^{-1/4}$  pour la distance entre noeuds est très bien vérifiée ce qui valide l'analyse. On peut alors aller plus loin, faire un calcul hydrodynamique pour déterminer  $\xi$ , et extraire ainsi une valeur numérique pour la constante de courbure K, ce qui donne directement  $l_p = K/k_B T$ . Une série correspondante d'expériences sur l'actine a donné  $l_p \simeq 7 \,\mu$ m.

## 8.5 Assemblage dynamique des filaments : polymérisation et dépolymérisation

Nous nous sommes focalisés jusqu'ici sur les propriétés structurelles et mécaniques des filaments considérés comme objets stables. De fait une caractéristique remarquable de ces assemblages est leur dynamique dont nous allons maintenant aborder certains aspects. Cette dynamique consiste essentiellement en la croissance ou décroissance des filaments par collection ou relargage de protéines globulaires, et est donc couplée à la composition chimique du milieu. Ainsi un milieu chimiquement hors d'équilibre (excès de formes énergétiques comme l'ATP) pourra induire des dynamiques particulières, et même générer des effets mécaniques fonctionnellement utiles.

### 8.5.1 Actine

*Première image* - Un filament d'actine (F-actine) croit par accrétion de "monomères" d'actine globulaire G-actine par ses deux extrémités ("plus" et "moins"). Ces réactions sont réversibles permettant la décroissance du filament par le même mécanisme.

De fait, la réaction d'ajout au filament d'un monomère, soit en termes schématiques Gact + Fact(n) -> Fact(n+1), est plus rapide à l'extrémité "plus" qu'à l'extrémité "moins". En termes de constantes de réaction on peut donc écrire  $k_{pol}^+ \ge k_{pol}^-$  (où les indices  $\pm$  désignent l'extrémité où la réaction a lieu). Ceci implique d'ailleurs que la réaction inverse de dépolymérisation Gact + Fact(n) <- Fact(n+1) est aussi plus rapide à l'extrémité "plus" (avec des notations évidentes  $k_{dep}^+ \ge k_{dep}^-$ ). En effet, le rapport des constantes cinétiques -> et <- doit être le même aux deux extrémités puisque les produits initiaux (un filament de n monomères et un monomère libre) et les produits finaux (un filament de n+1 monomères) sont identiques. En d'autres termes la constante de la loi d'action de masse, qui est thermodynamique, doit être la même aux deux extrémités, alors que les constantes cinétiques peuvent être différentes. A l'équilibre on a :  $k_{dep}^+/k_{pol}^+ = k_{dep}^-/k_{pol}^- = [Fact(n)]_{eq} \cdot [Gact]_{eq}/[Fact(n+1)]_{eq} = K$  constante de la loi d'action de masse.

Une autre conséquence de l'égalité de ces rapports, à ce niveau de description, est qu'on a soit croissance des deux extrémités si les monomères sont en excès (à des vitesses différentes aux deux extrémités), soit décroissance des deux extrémités si les monomères sont en défaut. En effet, la variation du nombre de monomères du filament s'écrit :

$$\frac{dn}{dt} = (k_{pol}^+[Gact] - k_{dep}^+) + (k_{pol}^-[Gact] - k_{dep}^-)$$
(8.1)

où le premier terme correspond à l'activité au bout "plus" et le deuxième à celle du bout "moins", ce qui peut être réécrit :

$$\frac{dn}{dt} = k_{pol}^{+}([Gact] - K) + k_{pol}^{-}([Gact] - K)$$
(8.2)

Les deux termes sont bien de même signe, qui dépend de l'excès ou non en protéines globulaires par rapport à la valeur critique d'équilibre  $K = k_{dep}^-/k_{pol}^- = k_{dep}^+/k_{pol}^+$ .

Une réalité in vitro plus complexe - De fait, la réalité est plus riche et plus subtile. En effet, La G-actine ne s'attache essentiellement aux filaments qu'après avoir fixé une molécule d'ATP. Une fois incorporé au filament, le complexe actine-ATP s'hydrolyse lentement, après un temps caractéristique de l'ordre de 20 s, pour donner un complexe actine-ADP. Du fait de ces constantes de temps, on a souvent la situation suivante dans les régimes d'excès de monomères : le filament croît principalement par l'extrémité "plus", et la section de ce filament proche de cette extrémité est composée essentiellement de monomères assez récemment incorporés, et donc de type actine-ATP non hydrolysés. Au delà de cette "tête", le filament est essentiellement constitué de "vieux" monomères hydrolysés d'actine-ADP.

Les constantes de réaction sont différentes selon que sont impliquées des actines avec ATP (notation GactT) ou des actines avec ADP (notation GactD). Nous ajoutons un T ou un D pour désigner séparément les constantes correspondantes. Dans la situation décrite (essentiellement des monomères GactT au bout "plus" et des monomères GactD au bout "moins"), la dynamique de croissance du filament est maintenant schématiquement :

$$\frac{dn}{dt} \simeq \left(k_{polT}^+[GactT] + k_{polD}^+[GactD] - k_{depT}^+\right) + \left(k_{polT}^-[GactT] + k_{polD}^-[GactD] - k_{depD}^-\right)$$
(8.3)

Dans nombre d'expériences in vitro l'ATP est en grand excès, et la concentration en GactD est très faible car cette espèce est instable (en solution, pas dans les filaments), on a essentiellement :

$$\frac{dn}{dt} \simeq k_{polT}^{+}([GactT] - k_{depT}^{+}/k_{polT}^{+}) + k_{polT}^{-}([GactT] - k_{depD}^{-}/k_{polT}^{-})$$
(8.4)

Les relations thermodynamiques type loi d'action de masse ne concernent que les réactions impliquant les même monomères :  $k_{depT}^+/k_{polT}^+ = k_{depT}^-/k_{polT}^-$  et  $k_{depD}^+/k_{polD}^+ = k_{depD}^-/k_{polD}^-$ . Mais elles ne contraignent pas le rapport  $k_{depD}^-/k_{polT}^-$ . De fait, des mesures in vitro donnent des nombres d'ordre  $k_{polT}^+ = 12s^{-1}\mu M^{-1}$ ,  $k_{depT}^+(ATP) = 1.4s^{-1}$  et une dynamique plus lente à l'extrémité "moins"  $k_{polT}^- = 1.3s^{-1}\mu M^{-1}$  et  $k_{off}^-(ADP) = 0.27s^{-1}$ . On a donc ici  $k_{depT}^+/k_{polT}^+ \leq k_{depD}^-/k_{polT}^-$ . De façon remarquable, l'équation (8.4) montre alors que, sur une gamme de concentrations de [GacT]

De façon remarquable, l'équation (8.4) montre alors que, sur une gamme de concentrations de [GacT] comprise entre ces deux valeurs (approximativement  $0.1 \,\mu$  M et  $0.2 \,\mu$  M), on peut avoir simultanément croissance (polymérisation) par l'avant et décroissance (dépolymérisation) par l'arrière! Cette situation hors équilibre produit un effet tout à fait étonnant de mouvement : sous le microscope le filament semble avancer ! Ce processus, dit de "treadmilling", a de fait été observé et caractérisé in vitro. Il est "motorisé" par l'excès d'ATP dans le système.

Une réalité in vivo encore plus complexe - Pratiquement, on observe in vitro des phénomènes similaires au treadmilling dans certaines parties de cellules en déplacement sur des surfaces, mais en général pour des filaments assemblés en gel et non des filaments isolés : le gel polymérise à l'avant et dépolymérise à l'arrière, accompagnant en celà le mouvement d'avancée de la paroi cellulaire.

Toutefois, dans le cytoplasme un nombre typique pour la concentration est  $[GactT] \sim 30 \,\mu M$ , beaucoup plus grande que les valeurs seuils mentionnées ci-dessus. On attend donc pour cette valeur une croissance systématique des deux extrémités et pas de dépolymérisation. Ce serait effectivement le cas, si d'autres protéines ne venaient pas interférer avec le processus, en particulier en accélérant la dépolymérisation. La description complète des processus observé implique donc de nombreux acteurs, ce qui donne à la cellule autant de leviers pour réguler croissance, décroissance (et treadmilling) de ses structures d'actine.

Pour fixer les idées quant aux cinétiques de polymérisation typiques pour l'actine, une vitesse typique de mouvement apparent de l'extrémité "plus" est  $V = k_{polT}^+ c \delta$ , où  $\delta$  est l'allongement du filament par monomère, d'ordre 5.5nm (taille du monomère) divisé par deux (deux brins par filament). Avec les valeurs données dans ce paragraphe, ceci donne in vivo un ordre de grandeur  $V \simeq 12 \times 30 \times 2.8 \ 10^{-3} \sim 1 \mu m/s$ .

### 8.5.2 Microtubules

La dynamique des microtubules se distingue de celle de l'actine par différents points :

(i) le "carburant" est différent : les dimères de tubuline fixent des molécules de GTP et non d'ATP, qui s'hydrolysent également lorsque le monomère a été incorporé au filament,

(ii) l'extrémité "moins" est souvent fixée (par nucléation) sur un organelle (le centrosome) ou sur d'autre corps, de sorte que la dynamique se fait alors par la seule extrémité "plus".

(iii) la décroissance à l'extrémité "+" se fait par des évènements violents, appelées de ce fait "catastrophes", qui conduisent à un pelage rapide des protofilaments et à leur désassemblage. Ces catastrophes peuvent conduire à la disparition complète du filament, ou être interrompus avant, par un évènement de "sauvetage" ("rescue" en Anglais), où le filament revient en phase de croissance.

Il résulte de ceci une dynamique saccadée, avec alternance rapide de phases de croissance régulière et de phases brèves de décroissance rapide. Cette dynamique permet de sonder l'espace environnant assez rapidement (des études suggèrent par exemple que c'est pendant la division cellulaire une stratégie efficace pour aller "pêcher" les chromosomes au sein du cytoplasme pour les organiser spatialement). La taille moyenne des microtubules souvent organisés en "asters" (ou oursins ..) dépend des réactions qui contrôlent cette dynamique, et donc in fine de la composition chimique du milieu, et en particulier de la concentration en monomères de tubuline et en GTP. Ces couplages peuvent dans certaines situations conduire à des instabilités dynamiques où cette longueur moyenne oscille dans le temps.

### 8.5.3 Génération de force et de mouvement

Au delà de l'exploration de l'espace, la dynamique de croissance par polymérisation des filaments peut également servir à générer forces et mouvement, ce qui est observable in vivo, et parfois quantifiable in vitro.

#### a- Génération de force par polymérisation de microtubules

Commençons par brièvement décrire une expérience assez récente <sup>1</sup>. L'extrémité "-" d'un microtubule est fixé sur une surface de verre, et on se place dans des conditions où l'extrémité "+" croît. On place un obstacle (une paroi) sur la "trajectoire" de l'extrémité "+". La polymérisation du microtubule au contact de l'obstacle est gênée par la présence de la paroi mais on observe qu'elle se poursuit. Ceci met le filament sous compression jusqu'à induire son flambement latéral. Puis le filament courbé continue à s'allonger, mais de plus en plus lentement.

L'observation que la polymérisation est capable de faire flamber le filament donne une première estimation des forces générées. En effet, un filament de longueur L et de constante de rigidité de courbure  $\kappa$  ne flambe que si la force de compression qui lui est appliquée est supérieure à un seuil. Ce seuil, par analyse dimensionnelle ne peut être autre chose que  $f_c \sim \kappa/L^2$  à une constante près (une analyse mécanique plus fine donne  $f_c = \pi^2 \kappa/L^2$ ). Dans l'expérience, la longueur du filament qui flambe est d'ordre  $L = 20 \mu m$ . En utilisant les données de ce chapitre quant aux microtubules, on trouve  $f_c$  de l'ordre du picoNewton (de nouveau). La polymérisation hors d'équilibre chimique d'un filament peut donc générer des forces supérieures à quelques picoNewtons, première évidence d'un couplage mécano-chimique.

Au delà du flambement on peut également utiliser les observations subséquentes pour quantifier ce <u>couplage entre mécanique et chimie</u> dont la logique est la suivante. D'une part l'obstacle exerce une force sur le filament, force dont la source est la dynamique de croissance hors équilibre du filament. D'autre part, en retour, la contrainte mécanique va tendre à limiter la réaction de polymérisation. En effet, si le filament est sous compression au contact de l'obstacle, il est plus difficile d'insérer un nouveau monomère.

Expérimentalement, on peut à partir de la forme du filament courbé et d'un calcul de mécanique assez simple déduire la force qui s'exerce sur son extrémité, et en suivant simultanément l'allongement du filament avoir une mesure de la cinétique chimique. Ceci peut être traduit en une courbe v(f) qui donne la vitesse d'allongement du microtubule en fonction de la force f qui appuie sur l'extrémité.

Le modèle le plus simple pour représenter le couplage consiste à supposer une dynamique activée (avec une barrière) et à proposer que la vitesse linéaire de croissance du filament, dans des conditions chimiques données, est de la forme

$$v(f) = v_{+} \exp(-f\delta_{+}/k_{B}T) - v_{-} \exp(+f\delta_{-}/k_{B}T)$$
(8.5)

où f est la force exercée sur l'extrémité du filament, et  $\delta_+$  et  $\delta_-$  caractérisent la façon dont f modifie la réaction Mtub(n) + tub -> Mtub(n+1) et sa réaction retour. Si  $\delta$  est l'allongement du filament par monomère ajouté, on s'attend en comparant les produits et les réactifs à ce que  $\delta = \delta_+ + \delta_-$  puisque le travail total de la force lors de cette réaction qui conduit à un allongement du filament de  $\delta$  est  $f\delta$ . On peut fitter les données expérimentales pour v(f) avec la forme proposée ci-dessus, et on trouve un accord correct avec  $\delta_- = 0$  et  $\delta_+ = 2$  nm. Mais ceci correspond à une valeur plus élevée pour  $\delta = \delta_+ + \delta_-$  que la valeur attendue, qui est la longueur d'un dimère (8 nm) divisée par le nombre de protofilaments (13) soit  $\delta \sim 0.6$  nm. Ce désaccord suggère une dynamique plus complexe au voisinage de la pointe du microtubule que celle à la base de l'éèquation (8.5).

#### b- Propulsion de la bactérie Listeria

Une autre manifestation de la génération de force par la polymérisation de filaments est la propulsion de bactéries du type *Listeria*. Celles-ci se meuvent au sein des cellules en polymérisant sur un de leur côté l'actine du milieu environnant. Les filaments produits s'assemblent en un gel qui forme une "comète" à l'arrière du corps de la bactérie. Ceci permet à la bactérie non seulement de se déplacer au sein des cellules, mais également de traverser la membrane cellulaire pour aller infecter une cellule voisine. La longueur de la comète reste finie parce que le gel dépolymérise après un certain temps. Notez le caractère ingénieux de cette stratégie où la bactérie utilise l'ATP (comme carburant) et l'actine (comme matériau) de son hôte pour effectuer son oeuvre d'invasion.

Rappelons un élément de base d'une telle propulsion : il n'y a pas de force nette extérieure exercée sur l'ensemble objet+comète. Comme on l'a vu pour la natation de micro-organismes (chapitre 2), il s'agit

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>"Measurement of the Force-Velocity relation for growing microtubules", M. Dogterom, B. Yurke, *Science*, **278**, 856-860 (1997)

en fait de forces internes. On peut ainsi faire un bilan des forces naif, pour la comète, et pour l'objet :

$$-\xi_{\rm ob}V_{\rm ob} + F_{\rm com->ob} = 0 \tag{8.6}$$

$$-\xi_{\rm com}V_{\rm com} + F_{\rm ob->com} = 0 \tag{8.7}$$

où  $\xi_i$  désigne le coefficient de friction hydrodynamique, et  $V_i$  la vitesse, pour *i* la comète ou l'objet, et  $F_{i->j}$  la force exercée par *i* sur *j*. Les forces internes sont de somme nulle de sorte que  $V_{ob} = -(\xi_{com}/\xi_{ob})V_{com}$ . Si l'objet avance, la comète elle recule, de façon souvent moindre car sa taille est plus grande que celle de l'objet et donc son coefficient de friction hydrodynamique plus faible.

La source du mouvement est la force interne  $F_{\text{com}->ob} = -F_{ob->com}$ . Celle-ci comprend d'une part les forces générées par la polymérisation, et d'autre part des termes de "friction" complexe entre la comète et l'objet qui impliquent le détachement et le réattachement du gel à la surface. Ces derniers dépendent de la vitesse relative  $V = V_{ob} - V_{com}$ . On voit qu'un modèle donnant  $F_{com->ob}$  en fonction de V permettrait de prédire la vitesse de propulsion observée  $V_{ob}$ .

La compréhension plus fine des mécanismes à l'oeuvre a progressé dans les dernières années, en particulier du fait des travaux expérimentaux et théoriques menés à l'Institut Curie de Paris. Expérimentalement, de grandes avancées ont été effectuées par l'étude de systèmes mimétiques où le corps de la bactérie est remplacé par un objet artificiel (bille colloïdale, goutte d'huile, vésicule) couvert de Act-A, le complexe permettant d'initier la polymérisation à la surface.

Du point de vue des modèles, une nouvelle génération a vu le jour qui propose d'incorporer les couplages mécano-chimiques suivants : (i) la polymérisation induit une déformation progressive du gel, (ii) celle-ci génère des contraintes dans le gel, et donc des rétroactions mécaniques sur la polymérisation comme dans le cas des microtubules au paragraphe précédent. Le point (i) est lié à la géométrie de la surface de l'objet : une couche de gel polymérisée en surface est nécéssairement étirée lorsqu'elle est repoussée de la surface pour faire place à une nouvelle couche plus fraichement polymérisée. Ces tensions latérales dépendent donc du rayon de courbure de l'objet, ainsi donc que la cinétique de polymérisation et la propulsion résultante.

### 8.6 Conclusions du chapitre

La cellule utilise la remarquable capacité de certaines protéines (nanométriques) à s'autoassembler en des filaments micrométriques de rigidité variable. Cette assemblage est dynamique, et directement couplé aux (dés)équilibres chimiques de l'environnement.

Il est possible de reconstituer in vitro ces filaments, ce qui a permis d'étudier leurs propriétés mécaniques et dynamiques avec grande précision.

Toutefois il faut garder à l'esprit que leur utilisation par la cellule se fait souvent par le biais d'un grand nombre de protéines associées, qui modifient statique et dynamique de l'assemblage dynamique. Parmi ces dernières, une famille particulièrement intéressante est celle des protéines motrices, que nous abordons dans le chapitre suivant.

## Chapitre 9

# Moteurs moléculaires - protéines motrices

Nous nous tournons maintenant vers une classe de nano-machines naturelles tout à fait étonnantes, les protéines motrices ou moteurs moléculaires, qui sont à l'oeuvre dans nombre de fonctions dynamiques de la cellule (ou d'organismes à échelle plus grande). Leurs performances sont remarquables, au point que leur étude est une des principales sources d'inspiration pour la réflexion sur les concepts et designs d'équivalents artificiels. Ce domaine de recherche est en plein essor depuis une vingtaine d'années, en particulier du fait de développements expérimentaux (micromanipulation, études de molécules uniques), et nombre des points présentés dans ce chapitre sont toujours l'objet d'étude.

## 9.1 Introduction : protagonistes et fonctions

Une recette couramment employée par la cellule pour assurer travail mécanique et transport est l'utilisation d'assez petites protéines, dites motrices, qui se déplacent le long des filaments polaires du cytosquelette. Les principales familles de telles protéines sont les kinésines et les dynéines qui se déplacent le long des microtubules, et les myosines qui se déplacent le long des filaments d'actine. Tous ces moteurs consomment de l'ATP pour se déplacer. Signalons pour être précis que des noms comme "kinésine" et "myosine" désignent en fait des familles de protéines, et qu'au sein de chaque famille il peut y avoir des variations notables de comportement et performances, même si les structures sont relativement similaires.

Nous nous focaliserons dans la suite de ce chapitre sur ces moteurs, mais de nombreux autres moteurs existent : des moteurs également linéaires comme l'ARN-polymérase qui se déplace le long de l'ADN (en utilisant la synthèse de l'ARN comme source d'énergie), des moteurs rotatifs comme la F1-ATPase ou le moteur rotatif des flagelles de bactérie (un complexe formé de nombreuses protéines qui utilise des différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane comme source d'énergie).

De façon remarquable, les mêmes types de moteurs sont utilisés dans quasiment toutes les espèces, ce qui donne une certaine généralité à leur étude. Ceci fait écho à une remarque générale importante pour ce cours, qui a trait à la notion d'universalité en physique et en biologie. En physique, on cherche souvent des lois s'appliquant de la façon la plus universelle possible. La nature, elle, dans de nombreuses situations utilise des dispositifs ou machines très sophistiquées et très spécifiques. On retrouve toutefois une forme d'universalité dans le monde biologique sous la forme suivante : si un dispositif (une enzyme par exemple, ou un sytème de transmission du patrimoine génétique) est efficace, alors l'évolution peut assurer sa généralisation à toutes les espèces. Nous allons ainsi dans ce chapitre donner des éléments de physique (théorique et expérimentale) qui s'appliquent de façon générale à tout moteur moléculaire, et aussi indiquer des particularités des protéines motrices naturelles, qui sont des exemples particuliers du point de vue de la physique, mais universels pour le biologiste.

Citons maintenant rapidement quelques *fonctions* essentielles dans lesquelles les moteurs précédemment cités jouent un rôle proéminent :

- des fonctions mécaniques : La contraction musculaire est assurée par le mouvement relatif de fibres

de myosines et de filaments d'actine. Chaque fibre de myosine possède un grand nombre de "têtes" motrices poussant sur le même filament. De même le battement des cils pour la natation de différents organismes est assuré par des dynéines qui imposent un mouvement relatif à des microtubules.

- des fonctions de transport : Les moteurs kinésines et dynéines assurent le transport le long des microtubules de nombres de composants chimiques (protéines en particulier) depuis la membrane cellulaire et la périphérie de la cellule (qui est en contact avec l'environnement extérieur) et le centre de la cellule (où l'information reçue est traitée et les protéines synthétisées). Les éléments à transporter le sont souvent au sein de petites vésicules ou tubes de membrane que les moteurs déplacent. Ce mode de transport intracellulaire est plus rapide et efficace qu'une diffusion thermique simple. Le traffic correspondant est bien sûr favorisé par l'organisation radiale (centre-périphérie) souvent observée pour les microtubules. Pour compléter l'image, les kinésines se déplacent (en général) vers l'extrémité + des microtubules et donc vers la périphérie, alors que la plupart des dynéines se déplacent vers l'extrémité et assurent donc le transport centripète.
- des fonctions d'organisation spatiale : Dans de nombreuses situations, le bon fonctionnement de la cellule nécéssite le positionnement relatif dans l'espace de structures. Les moteurs et filaments y participent souvent, assurant par un mécanisme actif (consommant de l'énergie) une organisation spatiale qui sinon se dissolverait progressivement. Ainsi les microtubules, kinésines et dynéines sont largement impliqués dans le positionnement remarquable des chromosomes avant duplication au moment de la mitose (division cellulaire). Ils sont également impliqués dans le positionnement dans la cellule de structures membranaires comme l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique.

La *structure* des protéines motrices consiste en général en (i) une partie, souvent composée de deux "têtes", qui assure le contact avec le filament et le mouvement le long de celui-ci, et (ii) une "queue" qui va permettre au moteur de s'attacher à l'objet à transporter où à la structure sur laquelle il faut exercer une traction. Chacune des têtes fait quelques nanomètres, et c'est à leur niveau que se déroule l'essentiel de l'activité mécanique. C'est donc logiquement à leur niveau que se fixe l'ATP, dont l'hydrolyse est la source d'énergie du mouvement, après laquelle sont relargués successivement le phosphate P et l'ADP. Dans le cas de la myosine, les queues peuvent s'associer entre elles pour former un filament, permettant aux différentes têtes de travailler collectivement sur un même filament d'actine (c'est par exemple le cas dans les muscles pendant la contraction).

Pour finir, signalons que l'observation in-vivo de mouvements induits par des moteurs suggère des vitesses allant du micron par minute au micron par seconde.

## 9.2 Détermination physique des propriétés des moteurs

Le fonctionnement et les performances de ces moteurs, ou plus précisément de ces couples filament/moteur, ont pu être grandement documentés dans les dernières décennies du fait de la possibilité de réaliser des expériences in vitro (ce qui nécéssite la purification des constituants, possible dans ce cas), et du développement des techniques de micromanipulation.

### 9.2.1 Tests de motilité et de bille

Comme il s'agit de caractériser le mouvement relatif du moteur et du filament, la plupart des expériences consistent en la fixation de l'un et le suivi du mouvement de l'autre.

Les tests de motilité ("motility assays" en Anglais) consistent en la fixation sur une surface de moteurs par leurs queues, réalisant ainsi un tapis de moteurs, et de l'observation par microscopie (par exemple de fluorescence) du mouvement de filaments sur de telles surfaces. On peut alors faire varier les conditions physico-chimiques (concentration en ATP, présence de sels comme Mg<sup>++</sup>) et voir l'influence de ces variations sur la vitesse moyenne des filaments. On peut également appliquer des actions mécaniques ou des champs électriques sur le filament pour tester les performances du moteur sous contrainte adverse ou favorable. Une difficulté centrale dans ces tests réside dans la fixation des queues des moteurs, qui doit laisser les têtes disponibles, non adsorbées sur la surface, et libre de rotation pour pouvoir s'orienter efficacement dans l'axe du filament.

Une autre famille de tests (tests de bille, ou "bead assays") consiste à fixer les filaments sur une surface et à fixer des moteurs sur des billes colloidales de quelques microns de diamètre. Ces dernières peuvent alors être utilisées comme "poignées" microniques pour manipuler les moteurs, les approcher des filaments, tirer dessus, etc... Idéalement, il faut diluer suffisemment les moteurs pour qu'un seul moteur sur la bille soit en contact à la fois avec le filament. Il est alors possible de suivre le mouvement de la bille (pas du moteur directement) le long du filament, mais également manipuler la bille par exemple avec des pincettes optiques. On peut ainsi caractériser un nanomoteur unique fonctionnant sous contrainte mécanique en fonction de son environnement biochimique, et mesurer par exemple la force d'arrêt nécéssaire pour l'immobiliser. Soulignons qu'on retrouve ici le fait, déjà mentionné pour l'étude de l'ADN, que la manipulation de systèmes nanométriques passe souvent par le développement et la mise en oeuvre de structures micrométriques.

### 9.2.2 Résultats typiques d'une expérience particulière : kinésine sur bille

Par un feed-back rapide on peut par exemple faire des expériences où la force sur la bille est maintenue constante dans le temps, et mesurer sa position. Si la force est assez grande, le lien bille-moteur est tendu, de sorte que la position de la bille renseigne sur celle du moteur avec bonne précision. Ce que l'on obtient alors est une trajectoire stochastique, avec des paliers, caractérisant l'arrêt provisoire du moteur à certaines positions, séparés par des "pas". Le signal est notablement bruité, mais on distingue nettement des pas de 8 nm pour la kinésine, soit exactement la période du protofilament d'une microtubule!

En répétant l'expérience on peut extraire différentes données statistiques pour chaque force appliquée et concentration d'ATP. La quantité la plus souvent reportée est la vitesse moyenne v, mais on peut également obtenir des informations plus fines comme la dispersion autour de cette moyenne. La vitesse en fonction de la concentration en ATP suit essentiellement la loi (classique pour les enzymes) de Michaelis-Menten,  $v = v_{max} \frac{[ATP]}{K+[ATP]}$  avec des coefficients  $v_{max}$  et K qui dépendent de la force appliquée  $f_{ext}$  (voir chapître 1.5). A [ATP] fixé, la vitesse en fonction de la force décroit depuis une vitesse "spontanée" à force nulle jusqu'à zéro pour la force d'arrêt.

### 9.2.3 Processivité

Une caractéristique apparaissant également dans ce type d'expérience est la "processivité" qui caractérise la capacité d'un moteur à rester sur un filament pour faire un grand nombre de pas de suite. Bien sûr cette processivité va dépendre de l'environnement et en particulier des contraintes exercées sur le moteur qui peuvent favoriser le détachement.

Typiquement les kinésines sont souvent assez processives (le fait d'avoir deux têtes permet de rester en contact avec le filament tout en détachant l'une des têtes). In vitro, cette processivité permet de réaliser des tests de bille performants, et de suivre ainsi un nombre significatif de pas successifs. Fonctionnellement, elle permet in vivo de transporter efficacement des vésicules du centre de la cellule vers l'extérieur sans avoir à changer trop souvent de filament.

Au contraire les myosines tendent à être très peu processives. Une raison fonctionnelle claire en est leur fonctionnement collectif pour la contraction musculaire : si une tête d'une fibre de myosine "collait" de façon trop forte au filament d'actine, elle nuirait à l'efficacité des autres têtes de la même fibre en train de "pousser" sur le même filament à ce moment là. En quelque sorte, pour limiter le frottement interne, il vaut mieux des moteurs qui donnent une brève poussée et se détachent ensuite rapidement.

Cette faible processivité des myosines pose des problèmes pour leur étude expérimentale in vitro à l'échelle du moteur individuel. Dans les tests de motilité sur tapis de moteurs, il faut un nombre de moteurs en contact avec le filament grand pour que le mouvement soit assez continu. Une autre approche, pour caractériser une myosine seule, a été développée à Stanford. Elle consiste à fixer sur une surface une bille couverte d'une faible densité de moteurs myosine, puis à approcher un filament d'actine tenu à ses deux extrémités par deux billes auxquelles il est collé. Chacune de ces deux billes est manipulée par un piège optique. Lorsqu'un moteur sur la surface donne un "kick" au filament, on peut observer celui ci par le mouvement de ces billes fixées aux extrémités du filament.

## 9.3 Fonctionnement des moteurs : quelques éléments génériques

Au sortir de la section précédente relative aux techniques expérimentales, et avant de présenter brièvement des modèles élaborés pour la description de tels nanomoteurs, arrêtons nous un instant pour récapituler un certain nombre d'observations et de remarques, qui serviront de cadre contraignant pour les modèles.

- En quoi sont-ce des moteurs? Deux définitions possibles et reliées d'un moteur (linéaire) sont : (i) une machine qui avance lorsque libre (en l'absence de force appliquée), (ii) une machine qui produit de la puissance mécanique  $-f_{ext}v$  en faisant avancer une charge à la vitesse moyenne v contre une force  $f_{ext}$ . La puissance fournie par le moteur est positive si cette force et la vitesse sont de sens opposés. Les protéines motrices répondent à ces deux définitions.
- Il n'y a pas de caractérisation unique de la performance d'un moteur et donc pas de classement naturel. On peut s'intéresser à sa vitesse propre  $v(f_{ext} = 0)$ , à sa force d'arrêt  $f_{ext}(v = 0)$ , où à une forme de rendement correspondant au rapport entre la puissance fournie  $-f_{ext}v$  et la puissance utilisée, mais il faut alors définir (souvent avec un degré d'arbitraire) celle-ci. Par ailleurs, pour la cellule, un "bon" moteur peut être celui qui remplit différentes taches, où qui est plus facile à synthétiser, réguler, etc...
- Les forces d'arrêt sont de quelques picoNewtons et les vitesses spontanées (sans force) peuvent atteindre le micron/s.
- Une protéine motrice seule adopte le long d'un filament un mouvement dirigé mais bruité. La description d'un tel mouvement est donc stochastique par nature. Comme le filament est périodique, on s'attend à ce que ces aventures stochastiques se répètent dans les mêmes conditions le long du filament, et donc, en reprenant la physique des marches aléatoires décrite au chapitre 4, que le mouvement à plus grande échelle puisse être caractérisé par une vitesse moyenne et un coefficient de diffusion effectif (théorème de la limite centrale).
- Le sens du mouvement le long du filament est fixé par la polarité du filament (en particulier il n'y a pas de moteurs associés aux filaments intermédiaires qui ne sont pas polaires).
- Sans ATP il n'y a pas mouvement.
- Il existe des attractions entre les têtes des moteurs et les filaments. Ces attractions, peuvent être mesurées. Elles ne peuvent être ni trop faibles ni trop fortes (quelques  $k_BT$ ) pour que les moteurs soient efficaces (puissent se déplacer et résister á des forces).
- Il y a des changements conformationnels au sein des têtes, qui sont couplés à la fixation, à l'hydrolyse de l'ATP et au relargage des produits de l'hydrolyse (P et ADP). Une échelle de temps généralement admise pour ces mouvements est la fraction de milliseconde.
- La diffusivité thermique (rapport de la conductivité et de la chaleur spécifique qui caractérise la vitesse avec laquelle la chaleur diffuse au sein d'un matériau) de l'eau à température ambiante est  $\sim 1.5 \ 10^{-7} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , et donc le temps d'homogénéisation des températures à l'échelle de quelques nanomètres est inférieur au dixième de microseconde. Il est donc difficile de se référer au schéma des moteurs thermiques du XIXè siècle où des flux de chaleur entre zone chaude et froide fournissent la puissance. Une description isotherme est plus adaptée.

## 9.4 Modèles

Après ces considérations, nous présentons brièvement quelques familles de modèles qui ont été proposés pour décrire le mouvement d'un moteur sur un filament, par couplage entre chimie et mécanique.

### 9.4.1 Près de l'équilibre thermodynamique : une description générique

Nous commençons par une approche générique qui est celle du voisinage de l'équilibre thermodynamique. La théorie de la réponse linéaire, développée au 20ème siècle, décrit alors par des arguments de symétrie sur les opérateurs d'évolution en jeu, comment des "forces généralisées" qui caractérisent le petit déplacement par rapport à l'équilibre de "potentiels", induisent des "courants généralisés", avec une relation linéaire (matricielle) entre forces et courants.


FIG. 9.1 – Schéma d'une protéine motrice.

Quelle forme prend cette théorie pour le moteur? Considérons dans la version la plus simple un moteur se déplaçant sur un filament linéaire (axe x), en transformant de l'ATP en ADP+P (Figure 9.1). Les forces généralisées sont ici la force extérieure  $f_{ext}$  appliquée sur le moteur, et la différence de potentiel chimique entre produits et réactifs :  $\Delta \mu = \mu_{ATP} - \mu_P - \mu_{ADP}$  (à l'équilibre thermodynamique, les deux sont nuls). Les courants généralisés sont la vitesse moyenne du moteur  $v = \langle \frac{dx}{dt} \rangle$  et sa consommation moyenne d'ATP par unité de temps notée r. Une façon d'appréhender ces définitions un peu arbitraires est d'évaluer la puissance consommée par le système : il reçoit une puissance mécanique  $f_{ext}.v$  et une puissance chimique  $\Delta \mu.r$  puisque chaque ATP hydrolysé procure une énthalpie (libre)  $\Delta \mu$ . On voit en ce sens le parallèle entre les couples ( $f_{ext}, v$ ) pour la partie mécanique et le couple ( $\Delta \mu, r$ ) pour la partie chimique. En régime permanent, la puissance reçue par le système moteur/filament  $\Pi = f_{ext}.v + \Delta \mu.r$ doit être égale à la puissance perdue, dissipée sous forme de chaleur dans le milieu environnant.

Si on est à l'équilibre thermodynamique,  $f_{ext} = 0$  et  $\Delta \mu = 0$ , et le moteur n'a aucune raison de se déplacer dans une direction ou l'autre le long du filament périodique, et la réaction ATP  $\langle = \rangle$  ADP +P est équilibrée : v = 0 et r = 0. Il faut noter que ceci n'empêche en rien une dynamique et des fluctuations. Il n'y a simplement pas de dérive mécanique ou chimique nette (pas de courants).

Pour de faibles forces  $f_{ext}$  et de faibles déséquilibres chimiques  $\Delta \mu$ , la réponse en terme de courants est linéaire :

$$v = \lambda_{11} \cdot \mathbf{f}_{ext} + \lambda_{12} \cdot \Delta \mu$$
  

$$r = \lambda_{21} \cdot \mathbf{f}_{ext} + \lambda_{22} \cdot \Delta \mu$$
(9.1)

où la matrice des  $\lambda_{ij}$  est la matrice de réponse donnant les courants en fonction des forces. Pour des raisons qui font appel à une théorie générale de la réponse des systèmes au voisinage de l'équilibre (en particulier menée par L. Onsager au milieu du XXème siècle), cette matrice est nécéssairement symétrique définie positive, ce qui assure que la puissance dissipée (consommée) lors de l'opération du moteur est positive  $\Pi = f_{ext}v + r\Delta\mu \ge 0$ . On a donc  $\lambda_{12} = \lambda_{21}, \lambda_{11} \ge 0, \lambda_{22} \ge 0$  et  $\lambda_{11}\lambda_{22} - \lambda_{21}^2 \ge 0$ . De façon logique, pour un moteur consommant de l'ATP (puissance chimique consommée  $r\Delta\mu \ge 0$ ), la puissance mécanique fournie par le moteur  $-f_{ext}v$  est nécéssairement inférieure à la puissance chimique consommée.

Il est à noter que v et  $f_{ext}$ , malgré les notations algébraiques simples pour ce problème unidimensionnel, sont des quantités vectorielles (transformées en leur opposé dans une symétrie miroir  $x \to -x$ ), alors que r et  $\Delta \mu$  sont intrinsèquement scalaires. Les coefficients non-diagonaux de la matrice  $\lambda_{12} = \lambda_{21}$  dans l'équation ci-dessus sont donc nécéssairement vectoriels par nature (et  $\lambda_{21}$ .f<sub>ext</sub> dans l'éèquation ci-dessus doit être compris comme un produit scalaire). Comme cette matrice est caractéristique de la structure moteur/filament, ces coefficients seraient par symétrie nuls si la symétrie spatiale de cette ensemble n'était pas polaire. L'existence d'un couplage entre chimie et mécanique dans ce formalisme ( $\lambda_{12} \neq 0$ ) est donc directement liée à la polarité du filament.

Le diagramme d'opération de ce nanomoteur dans le plan  $(f_{ext}, \Delta \mu)$  permet d'observer clairement trois types de zones (voir Figure 9.2) : des zones sans grand intérêt où le moteur consomme de l'énergie chimique et de l'énergie mécanique  $r\Delta\mu \ge 0$  et  $f_{ext}v \ge 0$ , des zones où il consomme de l'énergie chimique  $r\Delta\mu \ge 0$  pour produire de l'énergie mécanique  $-f_{ext}v \ge 0$ , (régimes où il agit comme un moteur), et des zones où il consomme de l'énergie mécanique  $f_{ext}v > 0$  pour produire de l'énergie chimique  $-r\Delta\mu > 0$ .



FIG. 9.2 – Diagramme d'opération du moteur dans le régime de la réponse linéaire. Les zones où il y a conversion d'une forme d'énergie utile en une autre par la protéine sont en grisé. Dans les autres le moteur consomme simultanément de l'énergie chimique et de l'énergie mécanique et ne produit que de la chaleur. La condition  $\lambda_{11}\lambda_{22} - \lambda_{21}^2 \ge 0$  assure que les zones "moteur" et "usine" sont disjointes.

Dans ce dernier régime il fonctionne comme une "usine chimique" activée mécaniquement par la force appliquée (qui produit l'espèce déjà en excès thermodynamique). Tout moteur est donc potentiellement aussi une usine (au moins près de l'équilibre). Et de fait, il a été expérimentalement démontré que certains systèmes rotatifs pouvaient agir comme moteurs ou usines suivant les conditions. De plus, cette description simple suggère que le moteur se dirige spontanément dans des directions opposées en excès d'ATP ( $\Delta \mu > 0$ ) et en excès d'ADP ( $\Delta \mu < 0$ ).

Vous pourrez examiner le rendement d'un moteur ou d'une usine, montrer que des définitions raisonnables pour chacun d'eux sont  $-f_{ext}v/r\Delta\mu$  pour un moteur et  $-r\Delta\mu/f_{ext}v$  pour une usine. Ces rendements ont au sein des secteurs concernés (Figure 9.2) une valeur maximale  $\eta_{max}$  (qui est la même dans les deux cas) atteinte pour certaines valeur du rapport  $\Delta\mu/f_{ext}$ . Ce rendement maximum vaut  $\eta_{max} = (1 - \sqrt{1 - \Lambda})^2/\Lambda$  où  $\Lambda = \lambda_{12}^2/(\lambda_{11}\lambda_{22})$  mesure l'importance du couplage mécano-chimique. Si  $\lambda_{12}$  est nul (pas de couplage dans (9.1)),  $\Lambda$  l'est aussi et le rendement maximal est nul. Dans la limite opposée si  $\Lambda$  approche la valeur limite autorisée qui est 1 (car la matrice (9.1) est définie positive), alors le rendement tend vers 1.

Pour finir, ce type de description linéaire permet-elle de décrire quantitativement ces moteurs dans des conditions in vivo? Non, et de très loin, car le stockage de l'énergie sous forme d'ATP conduit à des excès énormes de cette forme énergétique. Quelques nombres pour illustrer ceci. La différence de potentiel chimique dépend de la différence des potentiels standard et des concentrations :  $\Delta \mu = \Delta \mu_0 + k_B T \ln(\frac{[ATP]}{[ADP][P]})$ . Le premier terme vaut à peu près 13  $k_B T$ . Dans les conditions physiologiques, des chiffres raisonnables sont  $[ATP] = 10 \text{ mM}, [ADP] = 1 \mu \text{M}, [P] = 1 \text{ mM}, ce qui conduit pour le deuxième terme à environ 12 <math>k_B T$ . La force chimique  $\Delta \mu$  mesurant le désequilibre vaut donc 25  $k_B T \gg k_B T$ , et on est très loin de l'équilibre!

# 9.4.2 Une image classique : cinétique chimique pour changements d'états discrets

Une image plus classique en biophysique est d'essayer d'appréhender les changements de conformation du moteur au contact du filament, couplées à l'hydrolyse de l'ATP, par une description en termes d'états que le moteur visite avec une cinétique exprimée par des taux de transition. L'identification de ces "états" est souvent source de controverse expérimentale.

Discutons simplement ici un exemple très minimaliste, qui décrit un moteur cyclant entre trois états (ou plutôt types d'état) :  $M_i \ll (M-ATP)_i \to (M-ADP)_i \to M_{i+1}$ . Le moteur sur une protéine *i* du filament fixe un ATP, puis relargue successivement le P résultant de l'hydrolyse (non-décrite dans ce modèle ultrasimpliste), puis l'ADP pour revenir exactement à sa configuration initiale, mais sur la protéine suivante i+1. Ce type de modèle implique un couplage mécano-chimique fort : chaque hydrolyse de l'ATP par le moteur correspond à la progression de celui-ci d'une période le long du filament le filament (dans une direction fixée par la polarité de celui-ci), et inversement !

Dans nombre de modèles, la progression d'une période (notée p) le long du filament lors du cycle, est considérée se passer essentiellement lors d'une des transitions particulières, par un changement configurationnel important de la tête du moteur. Cette poussée "brusque" lors de la transition est appelée en Anglais "power stroke", et est communément utilisée pour représenter l'action des têtes de myosine sur l'actine. Pour les kinésines qui utilisent deux têtes, l'identification expérimentale précise de l'étape mécanique centrale qui permet la progression est plus complexe (souvenez-vous que ces moteurs sont nanométriques).

Les différentes transitions dans de tels modèles sont en principe réversibles, mais pour simplifier nous allons ici considérer que seule la première des réactions l'est véritablement. On peut noter  $k_1$  et  $k_{-1}$  les constantes de réaction correspondantes et  $k_2$  et  $k_3$  les taux de transition pour les suivantes. Alors, avec l'hypothèse de stationarité de la concentration des intermédiares, on retrouve une loi de Michaelis-Menten décrivant la consommation d'ATP par unité de temps et par moteur comme  $r = k_{max} \frac{[ATP]}{[ATP]+c_{sat}}$ . Les constantes introduites valent  $k_{max} = k_2 k_3/(k_2 + k_3)$  (dominé par le taux de transition le plus faible) et  $c_{sat} = \frac{k_2+k_{-1}}{k_2+k_3} \frac{k_3}{k_1}$ . Ceci est une description classique de l'activité d'une enzyme, et comme le couplage est fort, la vitesse

Ceci est une description classique de l'activité d'une enzyme, et comme le couplage est fort, la vitesse du moteur est simplement donnée par v = r.p où p est la période du filament (8 nm pour un microtubule), et suit donc également une loi de Michaelis-Menten (en accord avec l'expérience). Un tel modèle permet des rendements près de l'équilibre allant jusqu'à la valeur maximale 1 (comme vous pouvez le voir en imposant v = r.p dans la discussion du pargraphe précédent 9.4.1).

Pour décrire l'effet d'une force  $f_{ext}$  sur un tel système, une stratégie courante est d'anticiper que celle-ci modifie les taux de transitions sous la forme inspirée par le modèle de Kramers (chapître 4.4). Pour chacune des "réactions" de changement d'état introduites plus haut on peut ainsi modifier les taux de transition selon  $k_{\alpha} \rightarrow k_{\alpha}^{0} \exp(f_{ext}\delta_{\alpha}/k_{B}T)$ , avec  $\delta_{\alpha}$  une mesure de la distance selon x entre l'état de départ et la barrière cinétique limitant la réaction, en quelque sorte le bras de levier par lequel  $f_{ext}$  abaisse ou augmente la barrière. Les  $\delta_{\alpha}$  sont a priori nuls si la transition en question n'implique pas d'aspects mécanique (de déplacements). Comme les  $\delta_{\alpha}$  sont en général inconnus, il faut en principe pour les déterminer confronter ce modèle à des expériences effectuées pour différentes valeurs d'une force extérieure contrôlée (paragraphe 9.2.2). Toutefois ceci conduit à des fits avec de nombreux paramètres libres, et ne livre que rarement de message sans ambiguïté quand à la validité de tel ou tel modèle.

En particulier, l'identification du nombre d'états à inclure dans le modèle est une des difficultés principales de cette approche.

#### 9.4.3 Modèles hybrides à deux ou plusieurs états

Des expériences de micromanipulation ont montré que le couplage strict entre mécanique et chimie du modèle précédent est clairement trop restrictif (un moteur immobilisé par une force extérieure peut par exemple continuer à hydrolyser de l'ATP). Nous présentons dans ce paragraphe une voie possible pour la description de moteurs à couplage non total.

Une voie simple pour décrire un découplage partiel entre chimie et mécanique, est de traiter séparément l'avancement physique (par exemple par une variable continue x) et l'état chimique du moteur. La version la plus simple consiste à supposer que le moteur ne peut exister que dans deux états "chimiques" 1 et 2. On peut alors décrire l'interaction (attractive) du moteur avec le filament par un potentiel  $W_i(x)$  qui dépend de l'état *i* du moteur. Comme le filament, chacun de ces potentiels doit être périodique de période notée *p*, et comme le filament ils sont asymétriques (i.e. ils ne sont pas identiques à leur image dans la transformation  $x \to -x$ ).



FIG. 9.3 – Modèle à couplage faible à deux états : le moteur peut exister dans deux états 1 et 2. Dans chacun de ces états il interagit avec le filament qui est polaire et *p*-périodique. Ceci est décrit par les deux potentiels  $W_1(x)$  et  $W_2(x)$  qui ont donc les mêmes propriétés. Leur minima correspondent à des sites d'interaction préférentielle. Le moteur peut transiter de l'état 1 à l'état 2 entre autres par des mécanismes couplés à l'hydrolyse de l'ATP, par exemple 1+ ATP  $\rightarrow$  2 + ADP +P.

On peut alors décrire le transport stochastique du moteur suivant x et ses transitions entre ses deux états par des équations du type de celles proposées dans le chapitre 4 sur le mouvement Brownien. Dans un formalisme Fokker-Planck (paragraphe 4.3), on peut décrire l'évolution des densités de probabilité  $P_i(x,t)$  de trouver le moteur dans l'état i en x à l'instant t. Ceci donne :

$$\partial_t P_1 + \partial_x \left[ -D_1 \ \partial_x P_1 - (D_1/k_B T) \ P_1 \ \partial_x (W_1 - f_{ext}x) \right] = -\omega_1 P_1 + \omega_2 P_2 \\ \partial_t P_2 + \partial_x \left[ -D_2 \ \partial_x P_2 - (D_2/k_B T) \ P_2 \ \partial_x (W_2 - f_{ext}x) \right] = +\omega_1 P_1 - \omega_2 P_2$$

$$(9.2)$$

où le coefficient de diffusion thermique dans l'état *i* est noté  $D_i$ , et où on a supposé que la relation d'Einstein s'appliquait dans chaque état (la mobilité vaut  $D_i/k_BT$ ). Les taux de transition  $\omega_1$  et  $\omega_2$  entre états 1 et 2 dépendent a priori de *x*, mais doivent être *p*-périodiques comme l'environnement du filament. Notez que ce système d'équations décrit à la fois les transitions "chimiques" d'un état à un autre, et le mouvement spatial du moteur sous l'effet combiné de la force extérieure et de l'agitation thermique.

A l'équilibre thermodynamique,  $f_{ext} = 0$  et les taux de transitions doivent vérifier le bilan détaillé  $\omega_{1eq}(x)/\omega_{2eq}(x) = \exp(\frac{W_1(x)-W_2(x)}{k_BT})$ . Il est alors facile de montrer qu'il n'y a pas courants de probabilité et donc que la particule ne progresse pas en moyenne suivant x. Les équations ci-dessus décrivent alors un processus de diffusion effective à grande échelle.

Pour expliquer comment la chimie permet de s'écarter de ce bilan détaillé, il faut exprimer le couplage avec l'hydrolyse de l'ATP. Il y a différentes façons d'exprimer ce couplage. Par exemple on peut supposer que la transition de 1 vers 2 peut se faire d'une part spontanément (par activation thermique), d'autre part couplée à l'hydrolyse d'un ATP, et une contrepartie identique pour les transitions de 2 à 1. Une forme des taux de transition qui respecte le bilan détaillé (pour les états du moteur et pour l'ATP/ADP) est :  $\omega_1(x) = \left[k(x)e^{\mu_{ATP}^0/k_BT}[ATP] + \omega(x)\right]e^{W_1(x)/k_BT}$ ,  $\omega_2(x) = \left[k(x)e^{(\mu_{ADP}^0+\mu_P^0)/k_BT}[ADP][P] + \omega(x)\right]e^{W_2(x)/k_BT}$ , avec k(x) et  $\omega(x)$  des mesures de l'efficacité locale des réactions assistées par l'hydrolyse et spontanée (ces fonctions doivent aussi être *p*-périodiques), et  $\mu_i^0$  le potentiel chimique standard de l'espèce *i*. Vous pourrez vérifier qu'à l'équilibre chimique ATP<=

les taux de réaction  $\omega_{1,2}$  obéissent bien au bilan détaillé et qu'il n'y a pas de mouvement spontané (courant de probabilité suivant x nul en régime permanent). Si au contraire on a un large excès d'ATP, on effectue un "pompage chimique" du niveau 1 vers le niveau 2, et génériquement ceci conduit à un courant de probabilité suivant x, parce que les potentiels  $W_i(x)$  sont asymétriques.

Il n'y a pas de solution analytique générique, mais une résolution analytique ou avec un faible niveau de numérique est possible pour des choix (très) simples de  $W_i(x)$ , k(x) et  $\omega(x)$ . Il est également possible par perturbation de montrer que près de l'équilibre, on retrouve bien la formulation linéaire présentée au paragraphe 9.4.1. Avec ce type de modèles, le moteur peut faire plusieurs cycles  $1\rightarrow 2\rightarrow 1$  avant de progresser d'une période (découplage chimie/mécanique). En conséquence, les rendements peuvent être faibles (en particulier beaucoup plus faibles que dans les modèles à couplage fort).

## 9.4.4 Lien avec l'expérience

Il est difficile de discriminer de façon très claire parmi les nombreux modèles "en circulation", même si pour chaque type de moteurs des consensus se dégagent progressivement. Une raison est que ces modèles prédisent des comportements assez similaires pour les données de base (vitesse moyenne en fonction de la force appliquée et de la concentration d'ATP), ce qui pousse à chercher la discrimination sur des points plus subtils et plus difficiles d'accès à l'expérience.

D'autre part, tous les modèles n'ont pas le même statut : certains ne font appel qu'à un nombre limité de paramètres et cherchent plutôt à illustrer pédagogiquement des principes d'opération de tels moteurs, alors que d'autres cherchent à reproduire avec beaucoup plus de détail le fonctionnement d'un moteur particulier, parfois au prix d'un accroissement notable du nombre de paramètres dans le modèle (par exemple nombre d'états, de taux de transitions, et de position des barrières pour les modèles évoqués en 9.4.2).

## 9.5 Au delà : directions de recherche

Comme annoncé en introduction, l'étude des moteurs moléculaires est un domaine de recherches très actives.

C'est le cas pour le développement de mesures expérimentales toujours plus précises, qui permettent de remonter à des mécanismes intimes et spécifiques pour chaque moteur (par exemple "marche"-t-il par passage d'une alternatif tête devant l'autre ou par une suite de contractions et d'extension avec toujours la même tête devant ?). Ces démarches expérimentales visent pour la plupart à augmenter la résolutions spatiales et temporelles, avec l'espoir pour certaines d'imager aussi la cinétique chimique en cours, de façon à éclairer les controverses existantes mentionnées à la fin de la section précédente...

Une recherche dynamique existe aussi pour différents problèmes théoriques comme le fonctionnement collectif des moteurs (synchronisation, friction collective, ..), où même le développement d'une physique statistique adaptée à la description d'un nombre fini de trajectoires spécifiques de moteurs individuels, et de ses liens avec une thermodynamique plus macroscopique.

En parallèle, les observations sur les moteurs moléculaires et les concepts développés autour de cellesci stimulent la réalisation de systèmes artificiels actifs (synthèse de nouvelles molécules "moteur" ou de nano-assemblages, capables de transformer en énergie mécanique de l'énergie chimique, électrique, où lumineuse) ou de systèmes hybrides utilisant des moteurs biologiques couplés à des éléments artificiels.

Enfin, de très beaux problèmes concernent l'organisation spatio-temporelle d'assemblées de moteurs et filaments, organisation active (qui consomme de l'énergie), qui peut être stationnaire ou oscillante, et qui permet la génération de mouvement, de force, la réalisation de détecteurs actifs (oreille interne), et à terme l'organisation intracellulaire. Ces types d'organisation spontanée (mais active) à plus grande échelle, à partir d'un nombre assez limité de nanoacteurs, est un pan essentiel de la complexité du vivant.

## Chapitre 10

## Réseaux de régulation

## **10.1** Introduction

Ce dernier chapitre du cours est consacré à un système spécifique. Il est, d'une part, destiné à utiliser et à récapituler quelques concepts que nous avons développé dans les autres chapitres et, d'autre part, constitue une ouverture vers le thème important des réseaux biologiques. Ces réseaux dynamiques et complexes sont caractérisés par des interactions entre plusieurs éléments différents. Ils ne sont en général pas limités à l'échelle de la cellule : différentes cellules communiquent entre elles à l'échelle d'un organisme multicellulaire.

Nous considérons l'exemple simple mais concret de l'opéron lactose chez la bactérie E.coli, l'organisme unicellulaire le plus étudié au laboratoire. Après une introduction générale sur les différents mécanismes de régulation au sein de la cellule, nous présenterons l'opéron lactose. Ensuite nous allons identifier les paramètres physiques essentiels de ce système et considérer la modélisation de quelques résultats expérimentaux. Au niveau moléculaire, cet exemple de régulation repose sur une interaction entre une protéine et une séquence spécifique de l'ADN chromosomique de la bactérie. On appelle cette séquence spécifique l'opérateur. Dans la partie 4, nous traitons l'interaction protéine/ADN et, dans la partie 5, nous considérons la question de la stratégie et la vitesse avec laquelle la protéine trouve l'opérateur.

Chaque organisme, et en fait chaque cellule, adapte ses activités biochimiques (ou métaboliques) aux changements d'environnement. Seulement une partie du génome est mobilisée dans un environnement donné, lorsque l'environnement change certains gènes se trouvent moins utilisés qu'avant, d'autres plus.

L'activité biochimique de la cellule est assurée par les protéines. Comme décrit dans le chapitre 1, pour synthétiser une protéine l'information est d'abord extraite de l'ADN, transcrite en ARN messager par une ARN polymérase et ensuite traduite en protéine sur le ribosome. Une voix possible de régulation est de modifier le taux de transcription, les organismes procaryotes (i.e. cellules sans noyau) emploient presque uniquement cette voie. D'autre voix de régulation sont utilisés par les cellules eucaryotes (cellules avec noyau), modifications post-traductionnelles, repliement, assemblage et dégradation des ARNm et des protéines.

La bactérie de *E.coli* est un organisme procaryote, unicellulaire avec un seul chromosome qui porte  $\sim 2000$  gènes. Dans des conditions ordinaires la transcription d'une centaine de ces gènes est active.

## 10.2 L'opéron lactose

### 10.2.1 Mécanisme

Quand nous buvons du lait, une partie du sucre lactose n'est pas digérée directement par notre organisme, mais par des bactéries *E.coli* que nous hébergeons dans l'intestin. La bactérie ne peut pas utiliser le lactose directement comme source d'énergie et de carbone. Elle utilise une enzyme, la  $\beta$ -galactosidase pour catalyser l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. En absence de lactose la  $\beta$ -galactosidase est inutile. La bactérie adapte le taux de synthèse : peu de lactose  $\rightarrow$  peu de  $\beta$ -galactosidase, beaucoup de lactose  $\rightarrow$  beaucoup de  $\beta$ -galactosidase. Un sous-produit mineur de l'hydrolyse, la 1,6-allolactose sert d'inducteur. Cet inducteur se lie spécifiquement à une autre protéine, le represseur. En absence de l'inducteur le répresseur se fixe sur un des sites opérateurs O1, O2 ou O3 et inhibe la transcription de trois gènes (figure 10.1a). En présence de l'inducteur le répresseur est inactif et la transcription des trois gènes lacZ, lacY et lacA a lieu. Le gène lacZ code pour la  $\beta$ -galactosidase, lacY pour la perméase et lacA pour la transacétylase. La perméase est une protéine qui s'insère dans la membrane plasmique et assure un transfert actif de molécules de lactose de l'extérieur vers l'intérieur de la bactérie. Le rôle de la transacétylase n'est pas connu, cette protéine n'est pas nécessaire pour le metabolisme de lactose.

Pour comprendre l'effet de la synthèse de  $\beta$ -galactosidase et de perméase pour la bactérie il faut regarder à plusieurs échelles : moléculaire, cellulaire et éventuellement aussi au niveau population (figure 10.1.a-c). Les perméases doivent s'intégrer dans la membrane avant de devenir actives. Avec plus de perméases actives, la concentration en lactose augmente à l'intérieur de la cellule avec un effet de rétroaction sur l'expression du gène lac. Si le lactose est la source majeure d'énergie et de carbone, plus il y a de perméases actives, plus la bactérie croit et se divise vite. Nous présentons une modélisation d'une partie de ce réseau de régulation dans la section 10.3.



#### Figure 10.1 : Three levels of description.

(a) Molecular level. The three genes lacZ, lacY and lacA are cotranscribed as a polycistronic message from a single promotor P1. The gene lacZ encodes for the  $\beta$ -galactosidase, which can either break down lactose into  $\beta$ -D-galactose and D-glucose or catalyze the conversion of lactose into allolactose, the actual inducer. The product of lacY is the  $\beta$ -galactoside permease, which is in charge of the uptake of lactose inside the cell. The lac repressor is encoded by lacI, which is immediately upstream of the operon. Binding of the repressor to the main operator site O1 prevents transcription. Repression is greatly enhanced by the additional simultaneous binding of the repressor to one of the auxiliary operator sites O2 and O3. The inducer inactivates the repressor by binding to it and changing its conformation. Additionally, the CAP-cAMP complex must bind to the activator site, A, for significant transcription.

(b) Cellular level. Some gratuitous inducers, such as TMG, also use the lactose permease to enter the cell; but in contrast to lactose, they bind themselves to the repressor and are not metabolized by the cell. In this case, it is possible to study the dynamics of induction by considering as variables only the internal inducer concentration, the nonfunctional permeases, and the functional permeases.

(c) Population level. Coexistence of two types of networks in the lac operon is a population effect. Uninduced cells (empty circles) have some probability to become induced (full circles). If uninduced cells grow faster, both types of cells could coexist; if not, the entire population will eventually be induced.

Vilar et al, 2003.

Pour assurer un bon fonctionnement de la régulation de transcription il faut que l'interaction entre le répresseur et l'opérateur soit

- spécifique, pour réprimer la transcription juste au bon endroit (sur le bon gène) et avec une efficacité suffisante.
- réversible, pour pouvoir redémarrer la transcription quand ceci devient nécessaire.
- réactif, pour avoir un temps de réponse suffisamment court.

Spécificité et réversibilité de l'interaction entre represseur et ADN sont discutées dans la section 10.4 et la réactivité est sujet de la section 10.5.

## 10.2.2 Technique de mesure

On peut suivre la synthèse de  $\beta$ -galactosidase in-vivo grace à une réaction avec la molécule de X-Gal (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrClNO<sub>6</sub>). Cette réaction induit un changement de couleur, la bactérie initialement transparente devient bleu indigo.

### 10.2.3 Observations

- 1. On observe que chaque bactérie peut être seulement dans deux états, induite (concentrations élévées de  $\beta$ -galactosidase et perméases) ou non-induite (concentrations faibles de  $\beta$ -galactosidase et perméases).
- 2. Une autre observation est l'existence d'une concentration de maintenance en inducteurs. Lorsqu'on transfert une cellule induite dans un milieu où la concentration en inducteur est supérieure ou égale à sa valeur de maintenance elle reste induite. De la même façon, lorsqu'on y transfère une cellule non-induite elle restera non-induite.
- 3. Au niveau population on observe l'effet suivant. Si la bactérie mère est induite la fille est toujours induite. Si la mère est non-induite la fille peut néanmoins être induite. Ceci implique que, à environnement constant, la proportion des bactéries non-induites reste significative seulement si les bactéries non-induites se multiplient plus vite (possible uniquement en présence d'une autre source d'énergie et de carbone que le lactose).

## 10.3 Modélisation d'un réseau de régulation

Il existe d'autres inducteurs, comme la molécule TMG, qui utilisent la perméase pour passer à travers la membrane, mais qui contrairement à la lactose ne sont pas consommés par la cellule. Dans ce cas trois variables sont relévantes pour une description du fonctionnement du système lac au niveau de la cellule, les concentrations des perméases actives  $Y_f$ , des perméases inactives Y et des inducteurs dans la cellule I. De plus nous avons comme paramètre de contrôle la concentration des inducteurs à l'extérieur de la cellule  $I_{ex}$  et, comme quantité mesurée la concentration de  $\beta$ -galactosidase Z.

Afin de prédire l'évolution temporelle de la concentration de  $\beta$ -galactosidase Z(t), on écrit le système d'équations dynamiques

$$\frac{dY}{dt} = f_1(I) - a_1 Y \tag{10.1}$$

$$\frac{dY_f}{dt} = b_1 Y - a_2 Y_f \tag{10.2}$$

$$\frac{dI}{dt} = [f_2(I_{ex}) - f_3(I)]Y_f + b_2I_{ex} - a_3I$$
(10.3)

$$\frac{dZ}{dt} = gf_1(I) - a_3 Z , (10.4)$$

où  $a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, g$  sont des constants et  $f_1, f_2, f_3$  sont des fonctions de leurs arguments respectifs. La fonction  $f_1(I)$  de l'équation 10.1 d'écrit la synthèse enzymatique des perméases et, comme les gènes lacZ et lacY sont transcrits ensemble, la même fonction est utilisée pour la synthèse de  $\beta$ -galactosidase dans l'équation 10.4. Le coefficient  $b_1$  de l'équation 10.2 est un taux global pour l'intégration de la permease

et son activation dans la membrane plasmique. Le premier terme sur la droite de l'équation 10.3 d'écrit le transfert actif de l'inducteur à travers la membrane à l'aide des perméases, le deuxième terme décrit son importation passive. Pour des raisons de simplicité le même taux  $a_3$  est utilisé pour caractériser la décroissance temporelle indépendante des perméases dans les équations 10.3 et 10.4.

Le système d'équations 10.1-10.4 est seulement une approximation. En fait, chaque espèce doit être présentée par un nombre entier et pas par une concentration continue (sauf si N $\gg$ 1, mais il y a par exemple un seul site opérateur dans *E.coli*). L'équation de bilan doit être remplacée par une équation de maîtresse. Il faut introduire un bruit statistique qui représente le fait que la probabilité de réaction dépend des paramètres qui fluctuent et ne sont pas explicitement modélisés. Par exemple, les constants et fonctions  $(a_1-a_3, b_1, b_2, f_1, f_2)$  dépendent des coordonnés relatives des particules.

Quelques résultats d'une simulation sont présentés sur la figure 10.2. Les quatres équations couplées ont été traitées numériquement en considérant des nombres discrets pour chaque espèce et en ajoutant un bruit stochastique aux taux de transitions <sup>1</sup>.

Sur la figure 10.2 l'activité de  $\beta$ -galactosidase est representé en fonction du temps (temps mesuré en unité de génération de cellule). Le panneau a) correspond à une concentration faible en inducteur. Cellules individuelles (courbes grises), moyenne sur 2000 cellules (courbe noir continue) et moyenne avec effet de population (noir pointillé, il est supposé ici que les bactéries non-induites se multiplient plus vite). On observe que le temps de bascule vers l'état induit est rapide pour la cellule individuelle. L'évolution temporelle d'une cellule individuelle est très différente de l'évolution moyennée. Le panneau b) montre la prédiction du modèle pour un transfert de cellules induites (haut) et non-induites (bas) à une concentration de maintenance en inducteurs. Tous les courbes correspondes à des cellules individuelles. On trouve que pour cette concentration il n'y pas de bascule entre les deux types d'états, en accord avec l'observation expérimentale d'une concentration de maintenance.

## 10.4 Interaction entre protéine et ADN

La protéine répresseur interagit spécifiquement avec l'inducteur, une autre protéine. Cette interaction induit une transition structurale à longe portée dans la structure du répresseur. On appelle ce changement de conformation une transition allostérique et il démontre que dans les protéines les effets coopératifs peuvent être très importants (nous avons déjà rencontré un tel comportement chez les moteurs moléculaires de la section 9, où la liaison d'une molécule d'ATP à un site induit un mouvement de levier à un autre endroit loin sur la protéine). Sans l'inducteur fixé le répresseur présente une forte affinité pour la séquence d'opérateur de l'ADN. En fait le répresseur est une protéine tetramère qui aime se fixer sur deux sites opérateur distants sur l'ADN et ces interactions induisent une boucle dans l'ADN.

Pour l'interaction spécifique entre le site opérateur sur l'ADN et le represseur

$$ADN + R \stackrel{k_a}{\underset{k_d}{\leftarrow}} R/ADN,$$

la constante d'équilibre  $K_{eq}$  a été mesurée in vitro, en utilisant une technique d'électrophorèse. Pour cela on mélange des molécules d'ADN {ADN} et de represseurs {R}, on attend l'établissement de l'équilibre, on dépose le mélange dans un gel de polyacrylamide et on le fait migrer en applicant un champ électrique. L'état d'équilibre est conservé pendant la migration, car les mailles du gel empêchent la dissociation des complexes {R/ADN}. Les complexes migrent moins vite que les molécules d'ADN sans represseur et on trouve que  $K_{eq}$  vaut ~ 10<sup>-10</sup> M.

La constante cinétique  $k_a$  a également été mesurée in-vitro, en mélangant à t = 0 des molécules répresseur  $\{R\}$  et des molécules courtes d'ADN contenant chacun un site opérateur et une modification radioactive (ADN-<sup>32</sup>P). Ensuite plusieurs échantillons sont prélevés à différents temps t et déposés sur un filtre de nitrocellulose qui interagit fortement avec les represseurs. On lave la membrane pour éliminer les ADN sans represseur et mesure ensuite la radioactivité pour déterminer la quantité de complexes R/ADN-<sup>32</sup>P adsorbés sur le filtre. Une valeur de  $k_a = 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> a été mesurée.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Modeling network dynamics : the lac operon, a case study, J. M. G. Vilar, C. C. Guet and S. Leibler, J. Cell. Biol. 161, 471 (2003)



#### Figure 10.2 : Modeling results.

a) Single-cell, cell average, and population behaviour. The thin gray lines correspond to representative time courses of  $\beta$ -galactosidase content obtained from computer simulations for single cells at 7  $\mu$ M TMG. The observed differences in switching times from noninduced to induced states result from the stochastic behavior of the model. The thick continuous line is the average over 2000 cells. The dashed line is the population  $\beta$ -galactosidase content. To obtain the population results, it has been considered that induced cells grow slower than uninduced ones.

b) Maintenance concentration. Representative time courses of the  $\beta$ -galactosidase content obtained for induced (top) and uninduced (bottom) cells transferred to the maintenance concentration (5  $\mu$ M TMG) at time 0. Note the semilogarithmic scale. Vilar et al, 2003.

Pour l'interaction spécifique entre le répresseur et le site opérateur nous avons les ordres de grandeur suivants,

- Constante d'équilibre :  $K_{eq} = 10^{-10}$  M. - Constante d'association :  $k_a = 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

Une certaine affinité entre l'ADN et le represseur existe même en absence de la séquence d'operateur. Cette interaction non-spécifique est d'origine électrostatique et a un caractère dominant entropique. Elle est de six ordres de grandeur ( $K_{eq} \sim 10^{-4}$  M) plus faible que l'interaction spécifique, mais comme nous allons voir dans la section suivante, est néanmoins très importante pour notre système de régulation de transcription.

#### 10.5Comment le represseur trouve le site operateur sur l'ADN

La constante d'association  $k_a$ , presenté dans la section précédente, est grande. Comme nous allons voir dans les sections 10.5.1 et 10.5.2, son ordre de grandeur n'est pas compatible avec une approche de diffusion simple pour la recherche du site opérateur par le répresseur. La cellule adopte une strategie optimisée de recherche, proposée initialement par Berg, Winter et van Hippel (BWH) suite à une série d'études expérimentales et théoriques du represseur lac dans E.coli<sup>2, 3, 4</sup>. La stratégie de recherche

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Diffusion-Driven Mechanisms of Protein Translocation on Nucleic Acids. 1. Models and Theory, O. G. Berg, R. B. Winter and P. H. von Hippel, Biochemistry 20, 6929 (1981)

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Diffusion-Driven Mechanisms of Protein Translocation on Nucleic Acids. 2. The *Escherichia coli* lac Repressor-Operator Interaction: Equilibrium Measurements, R. B. Winter and P. H. von Hippel, Biochemistry 20, 6948 (1981)

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Diffusion-Driven Mechanisms of Protein Translocation on Nucleic Acids. 3. The *Escherichia coli* lac Repressor-Operator Interaction : Kinetic Measurements and Conclusions, R. B. Winter, O. G. Berg and P. H. von Hippel, Biochemistry 20, 6961 (1981)

BWH est employé par de nombreuses protéines pour localiser un site spécifique dans l'ADN ou l'ARN; elle est présentée en section 10.5.3.

## 10.5.1 Recherche par diffusion 3D : la limite de Debye-Smoluchowsky

Répresseur et opérateur peuvent se rencontrer simplement par leurs mouvements diffusifs, i.e. en effectuant des marches aléatoires en trois dimensions. Pour estimer la constante  $k_a$  pour ce mécanisme on considère une cellule sphérique de rayon R avec un site opérateur immobile au centre et des répresseurs libres de concentration  $c(\mathbf{r}, t)$ . On se place en régime stationaire, suppose une concentration  $c_{\infty}$  constante loin du centre et resoude l'équation de diffusion en coordonnés sphérique pour calculer le flux diffusif de répresseurs vers le centre. Nous supposons que l'opérateur est occupé par un répresseur lorsqu'un répresseur entre dans une petite sphère de rayon  $b \ll R$ . Nous considérons cette petite sphère comme un absorbeur parfait, i.e. chaque particule qui tombe sur la sphère disparaît. La concentration à l'infinie  $c_{\infty}$  est maintenue a une valeur constante  $c(\infty, t) = c_{\infty}$ . On montre que, pour r > b, l'équation de diffusion se réduit à l'équation de Laplace  $\Delta c = 0$ , en analogie avec le potentiel électrostatique d'une charge ponctuelle et en déduit la solution

$$c(r) = c_{\infty} \left( 1 - \frac{b}{r} \right)$$

Le courant diffusive correspondant est donné par

$$I = 4\pi Dbc_{\infty} = k_a c_{\infty}$$

Avec une constante de diffusion du répresseur de  $D \simeq 40 \mu m^2/s$ , (estimée avec la relation d'Einstein pour une particule de rayon 10 nm dans l'eau) on obtient comme limite supérieure pour la constante d'affinité une valeur de  $k_a = 10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Cette valeur théorique, la limite de Debye-Smoluchowsky, est un ordre de grandeur plus petite que la valeur mesurée. Par conséquent on peut conclure que la diffusion 3D n'est pas suffisamment efficace pour expliquer la reconnaissance rapide du site opérateur.

#### 10.5.2 Recherche par diffusion 1D

L'interaction non-spécifique entre répresseur et ADN est six ordres de grandeurs plus faible que l'interaction spécifique. Elle est néanmoins importante car le nombre de sites de fixation non-spécifique sur ADN est beaucoup plus grand (pour le chromosome de *E.coli*, par exemple,  $4.5 \cdot 10^6$  paires de bases comparé à un seul site opérateur). Si on suppose que le nombre de sites différents disponibles pour l'interaction non spécifique entre répresseur et ADN est égal au nombre de paires de bases de l'ADN on trouve que pour *E.coli* la probabilité pour un répresseur de se trouver sur l'ADN est de 99%. Cette observation suggere un autre mécanisme de recherche de l'opérateur, la diffusion 1D le long de la molécule d'ADN. Cette diffusion 1D devrait avoir lieu avec une constante de diffusion  $D_{1D} \cong 0.5 \mu m^2/s^5$ . Malgré l'avantage de sa dimensionalité reduite la diffusion 1D n'est pas suffisamment efficace. Le problème majeur est le fait que la longueur d'ADN explorée  $l_{sl}$  augmente lentement avec la durée  $t, l_{sl} \propto t^{1/2}$ . Pour explorer une séquence de 33kb ( $l_{sl} = 10\mu$ m par diffusion 1D le represseur aurait besoin de  $t = l_{sl}^2/D_{1D} \cong 200$ s). Dans la bactérie *E.coli* 100 répresseurs, même si ils sont bien distribués sur l'ADN, mettraient ainsi ~200 s pour bloquer la transcription. Tandis que le nombre de 100 represseurs est une valeur typique pour cette bactérie, la durée théorique de 200 s est trop longue par rapport à la réalité.

### 10.5.3 Recherche par diffusion mixte 1D et 3D : BWH

Berg, Winter et van Hippel ont fait des mesures détaillées sur les propriété d'équilibre et la cinétique de l'interaction entre le répresseur lac et l'ADN. Sur cette base ils ont développé un modèle et ont montré qu'une stratégie de recherche mixte 1D et 3D peut être plus efficace que la diffusion 1D et que la diffusion 3D. Plusieurs combinaisons faisant intervenir dissociation, association, diffusion 1D et diffusion 3D sont incluses dans leur description théorique. Sur la figure 10.3 quatre de ces combinaisons sont présentées schématiquement : (1) dissociation, diffusion 3D, puis fixation sur un site éloigné, (2) dissociation, diffusion

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>J. M. Schurr, Biophys. Chem. 9, 413 (1979)



**Figure 10.3 :** *Quatre manières différentes pour un represseur de changer d'endroit sur l'ADN.* Berg et al, 1981.



**Figure 10.4 :** *Exploration d'une séquence de base par diffusion 1D après association et avant dissociation. Halford et Marko, 2004.* 

3D, fixation sur un site proche, (3) transfert direct sur un site éloigné par rapprochement des deux brins d'ADN, (4) diffusion 1D le long de l'ADN. Il est important de noter que pour des distances supérieures à la longueur de persistance  $l_p$  l'ADN est flexible et peux rapprocher deux sites éloignés dans la séquence linéaire.

Les parties marche aléatoire 1D de la recherche selon BWH commencent par l'association du represseur a un endroit et se terminent par la dissociation (Fig.10.4). Leur durée typique est donc de l'ordre de l'inverse de la constante de dissociation de l'interaction non-spécifique,  $k_{d,ns}^{-1} \cong 100$  ms. La longueur d'ADN explorée est  $l_{sl} = (D_{1D}/k_{d,ns})^{1/2} = 200$  nm=  $4l_p$ . Après un temps  $T \gg k_{d,ns}^{-1}$  le répresseur a effectué de l'ordre de  $k_{d,ns}T$  marche aléatoires 1D. La longueur d'ADN explorée est  $L(T) \cong T (D_{1D}k_{d,ns})^{1/2}$ , si les marches aléatoires sont décorrélées. Il est important que contrairement au cas de diffusion 1D et 3D pure la longueur explorée augmente ici linéairement avec le temps. Pour l'exemple de la séquence de 33 kb on trouve un temps de recherche de  $T(L) = L/(D_{1D}k_{d,ns})^{1/2} \cong 5$  s. Cette durée est courte par rapport au 200 s que nous avons estimé pour la recherche par diffusion 1D.

## 10.6 Conclusions du chapitre

1. Une partie seulement du génome est mobilisée dans un environnement donné. Lorsque l'environnement change certains gènes se trouvent moins utilisés qu'avant, d'autres plus.

- 2. La bactérie d'*E.coli* régule le taux de synthèse de  $\beta$ -galactosidase au niveau de la transcription : peu de lactose  $\rightarrow$  peu de  $\beta$ -galactosidase, beaucoup de lactose  $\rightarrow$  beaucoup de  $\beta$ -galactosidase.
- 3. La protéine répresseur interagit spécifiquement avec l'inducteur, une autre protéine. Cette interaction induit une transition allostérique dans la structure du répresseur qui inhibe l'interaction spécifique entre le répresseur et l'ADN.
- 4. Une difficulté de la modélisation des réseaux biologiques consiste à identifier les paramètres essentiels. Il s'agit de savoir quels molécules et processus sont essentiels pour la régulation et de connaître (grace à des mesures) les différents taux de transition.
- 5. Pour obenir un temps de réponse suffisamment court, la cellule adopte une strategie optimisée de recherche, qui fait intervenir une diffusion 1D et 3D mixte. Ce mécanisme, employé par de nombreuses protéines pour localiser un site spécifique, a été proposée initialement par Berg, Winter et van Hippel (BWH).

## Chapitre 11

# Des neurones aux synapses : physiologie et principes de fonctionnement

Le but de ce chapître est d'introduire des notions de bases de neurobiologie, en partant de la description d'un neurone et des mécanismes d'émission de potentiels d'action, jusqu'à la description des propriétés collectives des réseaux neurones. C'est l'occasion de voir comment les outils de la physique sont à la fois au coeur des progrès expérimentaux, par exemple dans les méthodes d'imagerie de l'activité neuronale, mais sont aussi très utiles du point de vue conceptuel pour comprendre les propriétés démission de potentiel d'action, qui est l'unité d'information neuronale. Le contenu de ce chapître est complémentaire de l'amphi. Il se termine par un exercice (petite classe) portant sur un modèle tries utilisé de neurone, le modèle intègre-et-décharge.

## 11.1 Physiologie

En 1906, le physiologiste espagnol Ramon Y Cajal est récompensé par le prix Nobel pour ses travaux fondateurs sur l'organisation du système nerveux. En utilisant des méthodes de coloration mise au point notamment par Golgi dès 1873, il obtient des clichés spectaculaires des neurones, de la diversité de leurs formes et des réseaux de connexions établies entre ces cellules nerveuses. Un exemple, correspondant à un dessin de la rétine est donné en figure 11.1.

On observe une grande diversité de tailles, d'aspects, de densités de connexions suivant les régions cérébrales. Même à l'intérieur d'une population de neurones dans une même aire cérébrale, une grande diversité morphologique, ayant des conséquences fonctionnelles importantes, est observée. Les arbres des connexions issues des neurones ganglionnaires (dans la dernière couche de la rétine, fournissant ensuite l'information prétraitée au cortex visuel) couvrent des surfaces s'apparentant à des disques dont les rayons peuvent aller de 30 à 200 micromètres suivant les sous-types cellulaires.

Une vue imagée d'un neurone est montrée en figure 11.2. Un neurone est constitué d'un corps cellulaire et de ramifications, entrantes (appelées dendrites) et sortantes (appelées axones). Les terminaisons des axones de neurones sont en contact (en fait, ils sont séparés par un espace étroit, appelé fente synaptique, d'épaisseur variant entre 20 et 40 nanomètres) avec les dendrites d'autres neurones à travers des connexions appelées synapses. les synapses ont une structure interne complexe, que nous étudieront plus en détail en section 2 : ce sont elles qui contrôlent les interactions entre neurones. La taille du corps cellulaire varie entre 4 et 100 micromètres suivant les régions du cerveau et les organismes. Les axones ont un diamètre typique de 1 à 15 micromètres, mais peuvent être considérablement plus gros chez certaines espèces (calamars par exemple) comme nous le verrons par la suite. La longueur est très variable et peut aller jusqu'à 5 mètres chez la girafe! Le nombre de synapses par neurone (c'est-à dire sur son arbre dentritique entrant) varie typiquement entre 1000 et 10000.

A travers les espèces du monde animal, on observe des variations gigantesques du nombre de neurones



FIGURE 11.1 – Dessin de la rétine d'un mammifère par Ramon Y Cajal. Noter la structure inversée : les photorécepteurs constituent la couche la plus interne, la lumière devant traverser les autres neuronales (consitutées par les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires) avant d'y accéder.

et de connexions synaptiques, voir figure 11.3. Le nombre de synapses estimé est environ 3 ordre de grandeur plus grand que celui de neurones pour les mamifères. La répartition fonctionnelles des neurones est elle-même très variable suivant les espèces. Par exemple, la fraction de neurones dans le cortex est d'envrion 5% chez la souris et de 25% chez l'homme. Le nombre de récepteurs olfactifs (neurones détectant des odeurs) est d'environ 5 millions chez l'homme et de 200 millions chez le chien.

## 11.2 Le neurone : enregistrement, fonctionnement et modélisation

### 11.2.1 La technique du patch-clamp

Une technique très importante pour mesurer l'activité électrique des neurones est la méthode dite du patch-clamp (en anglais, patch = fragment de membrane, clamp = maintien). Elle consiste à mesurer soit le courant passant à travers une membrane cellulaire à différence de potentiel fixée (on parle alors de voltage-clamp), soit à msurer la différence de potentiel entre coté extra-cellulaire et coté intra-cellulaire d'une mebrane à courant fixé (on parle de current-clamp). Le schéma du fonctionnement de cette technique est donné en figure 11.4 dans la configuration current-clamp. On peut voir aussi sur la figure la photo d'une expérience sur un neurone en culture. Le patch-clamp est une technique essentielle de l'électrophysiologie, qui permet la mesure des courants et des différences de potentiels à l'échelle biologique, que ce soit au niveau d'un neurone, d'un canal ionique (voir description dans le paragraphe suivant), de la synapse, ...

### 11.2.2 Canaux ioniques

Une question essentielle est de comprendre les mécanismes qui permettent aux courants de passer à travers la membrane cellulaire. Ce passage est permis par la présence de canaux ioniques dans la membrane. Ces canaux sont consitués par des protéines transmembranaires, qui forment des pores permettant le passage des ions du milieu extra-cellulaire vers le milieu intra-cellulaire et vice-versa (figure 11.5). Chaque canal est sécifique et correspond à un type d'ion particulier :  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ , ... Il existe des centaines de types de canaux différents dans une cellule. En outre, on peut comprendre le passage



FIGURE 11.2 – Constituants d'un neurone.

Nombres de neurones et synapses dans les organismes vivants

			>
•	Eponge :	0	
•	Ver C-Elegans :	302	(5000)
•	Méduse :	environ 800	
•	Escargot :	11.000	
•	Mouche drosophile :	100.000	(10.000.000)
•	Fourmi :	250.000	
•	Cafard :	1.000.000	
•	Grenouille :	16.000.000	
•	Souris :	75.000.000	(100.000.000.000)
•	Pieuvre :	300.000.000	
•	Chat :	1.000.000.000	(1.000.000.000.000)
•	Chimpanzé :	7.000.000.000	. ,
•	Homme :	80.000.000.000	(100.000.000.000.000)

FIGURE 11.3 – Nombres approximatifs de neurones et de synapses dans différentes espèces animales.

des ions à travers le canal à l'aide du concept de porte (figure 11.5). Suivant que la porte est fermée ou ouverte, le passage des ions est bloqué ou possible.

L'ouverture/fermeture de la porte est contrôlée par la tension appliquée au canal, plus exactement à la différence de potentiels V entre les milieux extra- et intra-cellulaires. La relation entre le courant passant dans le canal, I, et la différence de potentiels, V, est

$$I = g_{canal} \times \left( V - E_{ion} \right) \,, \tag{11.1}$$

où  $g_{canal}$  est la conductance du canal (inverse de la résistance, exprimée en Siemens - S) et  $E_{ion}$  est une différence de potentiels, dite potentiel de Nernst ou potentiel de réversion. L'existence du potentiel de réversion est due à la différence de concentration de l'ion considéré dans les milieux extra- et intracellulaires. A l'équilibre thermodynamique, la différence des potentiels chimiques entre les deux milieux,  $\mu_{ext} - \mu_{int}$ , est compensée par le travail de la force électrostatique consécutive au passage de l'ion dans le canal. Si l'on note par q la charge de l'ion, on obtient

$$E_{ion} = \frac{\mu_{ext} - \mu_{int}}{q} = \frac{k_B T}{q} \log\left(\frac{c_{ext}}{c_{int}}\right) , \qquad (11.2)$$

où  $c_{ext}, c_{int}$  sont les concentrations extra- et intra-cellulaires de l'ion. On peut donner quelques ordres de grandeur de ces potentiels de réversion :

— Potassium  $K^+$ : q = 1e,  $c_{ext} \simeq 5$  nM,  $c_{int} \simeq 140$  nM, donc  $E_K \simeq -84$  mV. — Sodium  $Na^+$ : q = 1e,  $c_{ext} \simeq 140$  nM,  $c_{int} \simeq 12$  nM, donc  $E_K \simeq +40$  mV.

On voit que le signe peut être négatif ou positif suivant que la concentration intracellulaire est plus faible ou plus grande que la concentration extracellulaire.

Ainsi, la différence de concentrations entre milieux extérieur et intérieur crée une différence de potentiels  $E_{ion}$ . Si le voltage imposé V excède ce potentiel de réversion les ions auront tendance à sortir s'ils sont de charge positive et à entrer s'ils sont de charge négative (figure 11.6). Au contraire, si le voltage imposé est inférieur au potentiel de réversion, les ions positifs sortent et les ions négatifs rentrent (figure 11.6). Notez qu'un seul des deux cas est possible pour un canal donné du fait de sa spécificité. On a donc un mécanisme d'ouverture et de fermeture de la porte selon le signe de  $V - E_{ion}$ . Le courant I résultant est une fonction affine de V, en accord avec la formule (11.1). En pratique, des comportements non-linéaires peuvent être obtenus car la conductance  $g_{canal}$  dépend du voltage V.

#### 11.2.3Potentiels d'action : émission et propagation

Du fait de la présence de canaux ioniques dans la paroi cellulaire et le long des connexions dendritiques et axonales, un neurone est capable d'avoir une activité électrique particulière, que l'on appelle potentiel d'action. Un potentiel d'action est une variation très rapide dans le temps de la différence de potentiel entre les milieux extra- et intra-cellulaires, qui se propage le long du neurone et de ses connexions. Le mécanisme de génération est complexe, ses principales étapes sont résumées dans la figure 11.7.

Considérons un point particulier le long de l'axone par exemple. Dans l'état normal dit de repos, il existe une différence de potentiels V d'environ -70 mV entre milieux extérieur et intérieur. Les ions sodium sont en excès de concentration à l'extérieur et les ions potassium à l'intérieur. Du fait des valeurs des potentiels de réversion du sodium et du potassium, les deux types de canaux sont fermés au passage de ces ions (figure 11.7, dessin 1 en bas à gauche). Si, pour une raison particulière, le voltage V dépasse le seuil proche de -55 mV, les canaux ioniques de type sodium s'ouvrent et laissent rentrer les ions dans le milieu intracellulaire. Le passage de courant conduit à une augmentation très rapide de V (phase de dépolarisation, dessin 2 en haut à gauche de la figure 11.7). Puis, lorsque V atteint une valeur d'environ 30 mV, les canaux sodium se ferment alors que les canaux potassium s'ouvrent et permettent la sortie des ions potassium (figure 11.7, dessin 3 en haut à droite). Cette sortie s'accompagne d'une redescente très rapide de V, jusqu'à sa valeur repos (dessin 4, figure 11.7). La durée totale de cette onde de potentiel est très faible, de l'ordre d'une milliseconde (figure 11.7, dessin central). Par la suite, des pompes ioniques, qui sont des sortes de canaux actifs consommant de l'ATP vont permettre aux ions sodium en excès de sortir du milieu intracellulaire et de faire rentrer des ions potassium afin de rétablir les concentrations



FIGURE 11.4 – La technique du patch-clamp. Gauche : principe de fonctionnement. Droite : photo d'une expérience sur une culture neuronale; le diamètre de la micro-pipette est de 50 micromètres.



FIGURE 11.5 – Schéma de canal ionique. Le canal est spécifique pour un type d'ion particulier et muni d'une porte, qui permet ou bloque le passage des ions.



FIGURE 11.6 – Relation courant-voltage pour un canal ionique.

de repos (retour à l'étape 1). Cette étape de restauration des concentrations demande un certain temps (quelques millisecondes) pendant lequel le neurone est réfractaire à la gnénération de potentiel d'action.

Que se passe-t-il si on considère maintenant l'ensemble de l'axone et non plus un point particulier? Lorsqu'un potentiel d'action est généré à un endroit de l'axone, des courants de fuites le long de l'axone vont avoir tendance à modifier les propriétés des canaux ioniques aux positions voisines. Ce processus est symétrique et peut activer les canaux ioniques de type Na soit à gauche soit à droite du point initial avec les mêmes probabilités. Supposons qu'un potentiel d'action dans la portion immédiatement à droite soit généré. Alors la symétrie est brisée car la partie gauche de ce nouveau point est entrée dans sa période réfractaire. Le potentiel d'action ne peut que continuer à se propager vers la droite. Cette propagation a lieu en pratique à des vitesses très variables, allant de 1 à 100 mètres par seconde.

Dans une série de quatre articles publiés en 1952, Hodgkin et Huxley ont modélisé de manière très précise le mécanisme de génération et de propagation des potentiel d'action. D'un point de vue expérimental, ils se sont concentrés sur l'axone géant du calamar qui relie le cerveau aux organes moteurs (contrôle des muscles permettant l'expulsion de l'eau et des déplacement rapides). Ce nerf a un diamètre considérable (1 millimètre) rendant des mesures par patch-clamp très aisées. Des expériences de type voltage-clamp ont permis à Hodgkin et Huxley de mesurer la dépendance des conductances  $g_{canal}(V)$ dans le potentiel imposé et de rendre le scénario de la figure 11.7 quantitatif. Le modèle résultant est en très bon accord avec toutes les mesures électrophysiologiques. Plus de détails seront fournis pendant l'amphi. Ce tour de force à la fois expérimental et théorique est un haut fait de la biophysique et a été récompensé par le prix Nobel en 1963. Nous verrons en petite classe un modèle de neurone plus simple.



FIGURE 11.7 – Les différentes étapes de la génération d'un potentiel d'action.  $P_{Na}$  et  $P_K$  représentent les probabilités que les portes des canaux Na et K soient ouvertes. Voir texte pour une description détaillée.

### 11.2.4 Techniques de mesure de l'activité neuronale

Comment mesure-t-on l'émission de potentiels d'action en pratique? Une technique très importante est celle des enregistrements extra-cellulaires. Une ou plusieurs électrodes sont placées dans la région cérébrale à étudier et mesure le potentiel du tissu à cet endroit (figure 11.8). Ce potentiel peut être vu comme la superposition linéaires de gabarits, chaque gabarit étant le reflet de l'émission d'un potentiel d'action par un neurone dans le voisinage de l'électrode. Une étape importante et difficile du traitement du signal consiste à identifier dans de longs enregistrements du potentiel des gabarits qui se répètent dans le temps et les moments de leurs présence. On peut ainsi déterminer combien de neurones sont 'captés' par l'électrode et les temps d'émission des potentiels d'action correspondants.

Si on utilise non pas une mais plusieurs électrodes il est possible d'enregistrer l'activité d'un grand nombre de neurones. Les dispositifs les meilleurs à l'heure actuelle sont capables d'enregistrer des centaines de cellules in vitro et des dizaines in vivo. Ce dispositif peut permettre de suivre l'activité de cellules pendant des heures, le problème étant que le moindre mouvement des électrodes par rapport au cerveau change les neurones dont l'activité est mesurée.

D'autres techniques de mesure de l'activité neuronale font appel à l'imagerie et l'optique. On peut modifier génétiquement les neurones de manière à ce qu'ils émettent de la lumière lorsqu'un potentiel d'action est émis. Une possibilité consiste à insérer des sondes à calcium qui deviennent fluorescentes à



FIGURE 11.8 – Principe de l'enregistrement extracellulaire. Une électrode mesure le potentiel à un point du tissu cérébral, qui est affecté par l'émission de potentiels d'action par les neurones voisins. En identifiant les traces caractéristiques des potentiels de chaque neurone, on peut savoir quel neurone a émis un potentiel d'action et quand a eu lieu l'émission.

haute concentration en cet ion. Les variations de concentration de calcium sont fortes lors de l'émission de potentiels d'action et rendent les sondes fluorescentes. On peut alors imager localement une zone d'intérêt et mesure l'activité, neurone par neurone. Certains organismes, comme la larve du poisson zèbre, sont transparents et peuvent donc être imager dans leur intégralité. Il est possible de mesurer l'activité d'une grande partie voire de l'ensemble du cerveau de ces organismes, c'est-à-dire des dizaines de milliers de neurones en temps réel.

## 11.3 Les interactions : description et plasticité

### 11.3.1 Description des synapses

Une synapse est une connexion entre une axone et une dendrite de deux neurones, appelés neurones présynaptique et postsynaptique (il existe des rares cas où un même projette son axone sur une de ces dendrites, on parle alors d'autapse). Un axone donne généralement lieu à de nombreuses synapses, ou boutons synaptiques, voir figure 11.9 gauche. Lorsque le neurone présynaptique émet un potentiel d'action, cette onde de dépolarisation de la membrane se propage le long de l'axone jusqu'à arriver aux boutons synaptiques. A travers un mécanisme complexe que nous allons décrire ci-dessous, chaque synapse produit une petite différence de potentiel dans le neurone post-synaptique, voir figure 11.9 droite. Cette différence de potentiel, de l'ordre de quelques millivolts, peut être soit positive, soit négative. On parle de synapse, respectivement, excitatrice ou inhibitrice et de potentiel postsynaptiques excitateurs ou inhibiteurs (en anglais, EPSP = excitatory post-synaptic potential et IPSP = inhibitory post-synaptic potential). Le type de synapse est fixé par le neurone présynaptique : toutes les boutons synaptiques terminant un axone sont du même type, comme nous le verrons ci-dessous.

Le neurone postsynaptique intègre ces EPSP et les IPSP dans le temps et dans l'espace. Considérons le cas de la figure 11.10 gauche, où un neurone reçoit des EPSP d'un seul neurone présynaptique actif. Si ces EPSP sont reçus à une fréquence trop faible, c'est-à-dire s'ils sont séparés dans le temps par un délai supérieur à une dizaine de millisecondes (cas 1 dans la figure), le potentiel membranaire a le temps de relaxer vers sa valeur de repos entre deux entrées d'EPSP successives. Le neurone postsynaptique reste donc proche de son état de repos et ne génère aucun potentiel d'action. En revanche, si la fréquence augmente (cas 2), la relaxation n'a pas le temps d'avoir lieu et les EPSP se somment les uns aux autres. Le neurone postsynaptique peut voir son potentiel membranaire dépasser le seuil ( $\simeq -50$  mV) d'instabilité



FIGURE 11.9 – Gauche : schéma d'un neurone présynaptique, de son axone portant les boutons synaptiques, et d'un neurone postsynaptique avec ses dendrites. Droite : le neurone postsynaptique reçoit des petits potentiels à chaque fois que les neurones présynaptiques émettent des potentiels d'actions; ces petits voltages peuvent positifs (EPSP) ou négatifs (IPSP) selon le type des synapses.

conduisant à l'émission d'un potentiel d'action (figure 11.7).

Considérons maintenant le cas de la figure 11.10 droite, où un neurone reçoit des EPSP de trois neurones présynaptiques actifs, A, B et C. Chacun de ces neurones émet un seul potentiel d'action. Si les trois EPSP sont reçus à des temps trop différents les uns des autres (cf. échelle de temps de 10 millisecondes évoquées ci-dessus), le potentiel membranaire a le temps de relaxer vers sa valeur de repos entre les entrées d'EPSP successives. Le neurone postsynaptique reste au repos et ne génère aucun potentiel d'action. En revanche, si les trois EPSP sont reçus de manière suffisamment rapprochée, ils se somment les uns aux autres. Le neurone postsynaptique peut émettre un potentiel d'action.

La bouton synaptique est un système complexe, qui est schématisé sur la figure 11.11. Lorsque le neurone présynaptique génère un potentiel d'action, celui-ci est transporté par l'axone et arrive au bouton synaptique. Ce bouton contient de petits sacs, appelés vésicules, de neurotransmetteurs ou neuromédiateurs, capables de franchir la fente synaptique et de se lier à des récepteurs situés sur les dendrites du neurones postsynaptique. L'arrivée du potentiel d'action déclenche une forte augmentation de la concentration en ions  $Ca^{2+}$  dans le bouton synaptique. Ces ions vont déclencher la libération des neurotransmetteurs et leur migration. L'attachement des neurotransmetteurs aux récepteurs postsynaptiques conduit à l'émission de petits changement du potentiel dans le neurone postsynaptique (EPSP, IPSP) par suite de l'ouverture de canaux Na excitateurs ou K inhibiteurs. Les neurotransmetteurs se détachent alors des récepteurs et sont disponibles pour être, à travers un procesus complexe, recrutés par le bouton présynaptique et emagasinés à nouveau dans les vésicules. La concentration en calcium revient à sa valeur de repos grâce à l'action de pompes.

Il existe plusieurs types de neurotransmetteurs, notamment le glutamate qui intervient dans de nombreuses synapses excitatrices et le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) qui est à la base de la plupart des synapses inhibitrices. La nature du neurotransmetteur est propre au neurone présynaptique, ce qui explique que les synapses issues d'un même neurones sont toutes excitatrices ou inhibitrices. L'existence de neurones inhibiteurs (appelés interneurones) est très importante : elle permet d'introduire des rétroactiions négatives et de stabiliser l'activité des réseaux, afin de prévenir un emballement de l'activité. Un exemple est donné en figure 11.12, qui montre comment un circuit neuronal simple, composé de deux neurones peut en principe donner naissance à une activité bistable périodique.



FIGURE 11.10 – Le neurone postsynaptique agit à la fois comme un intégrateur temporel (gauche) et spatial (droite) des potentiels d'actions émis par les neurones présynaptiques, avec des pondérations dépendant des synapses. Les courbes du bas montrent le potentiel membranaire postsynaptique en fonction du temps; on distingue les petites augmentations du potentiel (EPSP) produites par les synapses. Voir texte pour une description détaillée.

#### 11.3.2 Mécanismes d'apprentissage : potentiation et dépressions synaptiques

Une propriété remarquable et d'importance capitale est que l'intensité de l'EPSP ou IPSP dans le neurone postsynaptique suivant l'arrivée d'un potentiel d'action présynaptique est variable au cours du temps. Ce phénomène est appelé plasticité synaptique.

Le mécanisme sous-jacent à cette plasticité est d'origine chimique. Le nombre de vésicules synaptiques libérés suite à l'arrivée d'un potentiel d'action ainsi que le nombre de récepteurs postsynaptiques, voire la qualité des neurotransmetteurs peuvent varier au cours du temps. L'existence d'un tel mécanisme, qui est le fondement microscopique de l'apprentissage, avait été suggérée par Ramon Y Cajal dès 1894 : la mémorisation provient de la modification des couplages entre neurones plutôt que de l'apparition de nouveaux neurones. Cette suggestion, à la base de la théorie du connexionisme fut théorisée par Hebb en 1949 : le renforcement ou la dépression synaptique ont lieu suivant que les neurones pré- et postsynaptiques ont tendance à être actifs ensemble ou pas. Qu'en est-il des résultats expérimentaux?

Le premier résultat expérimental probant fut obtenu par Bliss et Lomo en 1973. Leur expérience est schématisée en figure 11.13. Bliss et Lomo ont stimulé une région particulière de l'hippocampe, une zone cérébrale très importante pour la formation de nouvelles mémoires, l'aide d'une électrode et mesuré le résultat de cette stimulation sur des cellules nerveuses de la région CA1 de l'hippocampe par une deuxième électrode. On peut mesurer une sorte d'intensité synaptique effective à travers la variation du potentiel membranaire des cellules proches de la deuxième électrode consécutive à une stimulation. Cet EPSP effectif est montré en figure 11.13 bas, et est proche de zéro (première partie de la courbe). Bliss et Lomo ont alors procédé à un protocole de stimulations intense, de haute fréquence (quelques dizaine de Hertz, zone vert foncée en figure 11.13) pendant une dizaine de minutes. Ensuite, ils ont mesuré comme précédemment l'EPSP consécutif à une stimulation isolée et ont observé une forte augmentation. Cet effet est durable : il subsiste pendant des heures, voire des jours. Il porte le nom de LTP, pour long-term potentiation en anglais. Les connexions synaptiques peuvent être renforcées si l'activité est intense. Remarquablement, le phénomène inverse est également observé. Si on perturbe de manière répétée



FIGURE 11.11 – Schéma d'un bouton synaptique et des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, libérés lors de l'émission d'un potentiel d'action par le neurone présynaptique.

l'activité de neurones qui sont connectés entre eux de manière à diminuer les fréquences de ces neurones, ont obtient un effet dit de LTD, long-term depression : l'EPSP devient plus faible de manière durable.

Plus récemment, dans les années 1990, de nouveaux résultats ont été obtenus, qui mettent en évidence l'importance de la plasticité synaptique sur des échelles de temps courtes. Ces expériences sont schématisées en figure 11.14. On stimule un neurone présynaptique et un neurone postsynaptique de manière répétée en maintenant le délai  $\tau$  entre les deux stimulations à une valeur constante.  $\tau = t^{pre} - t^{post}$  peut être positif ou négatif, selon que l'on impose que le neurone présynaptique est actif après ou avant le neurone postsynaptique respectivement. Ensuite, on mesure la réponse à une stimulation du neurone présynqptique pour estimer l'EPSP. L'expérience montre que l'interaction synaptique a augmenté suite à la stimulation si  $\tau < 0$  et a diminué si  $\tau > 0$ . Plus le délai  $\tau$  est faible en valeur absolue, plus l'effet de potentiation du couplage synaptique n'est observée (figure 11.14). Cette plasticité dépendant de l'ordre temporel des potentiels d'action peut durer pendant des minutes.



FIGURE 11.12 – Mécanisme d'un 'clignotant' neuronal. Un neurone excitateur est stimulé par une entrée excitatrice constante et devient actif (voir train de potentiels d'action en bas de la figure). Il active alors un neurone inhibiteur, qui émet des potentiels d'action jusqu'à 'éteindre' le premier neurone, et, par voie de conséquence, lui-même. Ce processus peut alors reprendre de manière périodique.

## 11.4 Conclusions du chapitre

- 1. les neurones sont constitués de dendrites récoltant les entrées synaptiques venant des autres neurones, d'un corps cellulaire réalisant une intégration spatio-temporelle de ces entrées donnant lieu, et une sortie appelée axone.
- 2. l'unité d'information neuronale est le potentiel d'action, une onde de dépolarisation de quelques dizaines de millivolts, et qui se déplace le long des axones jusqu'aux boutons synaptiques.
- 3. les synapses permettent de réaliser des connexions entre neurones, de signe, de poids, de délais variés. En outre, ces interactions sont modifiées par l'activité neuronale à travers des mécanismes de potentiation ou de dépression.



FIGURE 11.13 – L'expérience de Bliss et Lomo qui a mis en évidence le phénomène de potentiation synaptique à long terme.



FIGURE 11.14 – Illustration du protocole expérimental (haut) et du résultat (bas) d'une expérience de mise en évidence de la plasticité synaptique dépendant du temps.

## 11.5 Petite Classe : Le neurone intègre-et-décharge

Le but de cette petite classe est de se familiariser avec le modèle de neurone intègre-et-décharge, introduit par Louis Lapicque en 1907.

#### Propriétés élémentaires du modèle

Le neurone intègre-et-décharge est une version simplifiée du modèle de Hogkin et Huxley. Le neurone somme des entrées (courant extérieur, courants synaptiques, ...) ce qui fait croître son potentiel de membrane. Par ailleurs le potentiel décroît en un temps caractéristique  $\tau_m$  à cause des courants de fuite. Si le potentiel de membrane dépasse un seuil, un potentiel d'action est émis et se propage le long de l'axone; le potentiel de membrane est alors réinitialisé à sa valeur de repos. L'équation régissant le potentiel de membrane est

$$\tau_m \frac{dV}{dt} = -(V - V_L) + R_m I_e .$$
(11.3)

Des valeurs typiques des paramètres sont :  $V_L = -65 \text{ mV}$ ,  $R_m = 90 \text{ M}\Omega$ ,  $\tau_m = 30 \text{ ms}$ . Quand le potentiel de membrane atteint la valeur  $V_{seuil} = -50 \text{ mV}$ , un potentiel d'action est émis et le potentiel de membrane reprend sa valeur de repos  $V_L$ .

**a.** Dessiner l'allure du potentiel de membrane en fonction du temps t.

**b.** Déterminer le taux de décharge f (nombre de potentiels d'actions émis par seconde) en fonction du courant  $I_e$ , et comparer avec l'allure de la ligne pleine de la figure A.

#### Phénomène d'adaptation

En fait, les enregistrements in vivo montrent qu'en présence d'un stimulus (courant d'entrée) constant la fréquence de décharge n'est pas constante mais a tendance à diminuer au cours du temps, voir figure B. Ce phénomène important est appelé adaptation. Pour tenir compte de l'adaptation, on inclut dans l'équation (11.3) un terme de courant supplémentaire, qui prend en compte l'augmentation de l'activité des canaux potassium tendant à hyperpolariser la membrane :

$$\tau_m \frac{dV}{dt} = -(V - V_L) - r_m g_{ad} \left( V - V_{ad} \right) + R_m I_e .$$
(11.4)

La conductance associé à ce courant relaxe vers zéro avec une constante de temps  $\tau_{ad}$ :

$$\tau_{ad} \frac{dg_{ad}}{dt} = -g_{ad} \ . \tag{11.5}$$

A chaque fois qu'un potentiel d'action est émis, la conductance augmente discontinûment :

$$g_{ad} \to g_{ad} + \Delta g_{ad} \ . \tag{11.6}$$

**a.** On choisit  $\tau_{ad} = 100$  ms,  $r_m \Delta g_{ad} = 0.6$  et  $V_{ad} = -65$  mV. Le résultat de l'intégration numérique de l'équation (11.4) est montré en figure C. Expliquer brièvement pourquoi l'introduction du nouveau courant permet de ralentir progressivement le taux de décharge.

b. Montrer que, lorsque le taux de décharge est très grand devant les autres fréquences (en particulier, devant  $1/\tau_{ad}$ ), il est approximativement donné

$$f_{ad}(I_e) \simeq f(I_e) \frac{1 - e^{-z}}{z} \quad \text{où} \quad z = r_m \Delta g_{ad} \frac{\tau_{ad}}{\tau_m} .$$
(11.7)

Cette prédiction est-elle en accord avec les données de la figure A?



<u>Figure :</u> A : Comparaison des taux de décharge en fonction du courant d'entrée entre un neurone intègre-et-décharge (ligne, même paramètres que dans l'énoncé) et un neurone cortical (cellule pyramidale du cortex visuel primaire du chat) in vivo. Les cercles pleins montrent l'inverse du délai (ISI) entre les deux premiers potentiels d'action, les cercles vides correspondent au taux stationnaire après adaptation. B : Enregistrement du potentiel de membrane d'un neurone cortical lors d'une injection de courant constant montrant le phénomène d'adaptation. C : Résultat d'une simulation du modèle (2) avec les paramètres de l'énoncé et un courant constant d'entrée appliqué pendant 300 ms.

Extrait de P. Dayan et L. Abbott, Theoretical Neuroscience. MIT Press, 2001.