

Forces (mechanical et biochemical) at the scale of the cell: From molecular bonds to tissues

Bertrand Fourcade
Bertrand.Fourcade@ujf-grenoble.fr

19 mars 2018

Physical approaches to cell mechanics and cell signalization

Living systems offer the best collection of nano-machines working under **extremal** conditions :

- 1 Work at a scale where Brownian noise dominates
- 2 Work at a scale where initial forces play a minor role
- 3 Work at a scale where fluid motion is not chaotic (low Reynolds limit)
- 4 Work with remarkable efficiency
- 5 **Self-assemble** (Soft Matter physics) and **self-organize** from molecules to tissues (Biology, multi scale)

Conclusion

Cells seen as the smallest integrated living systems. They use efficient strategies to self-organize. These strategies are based on biochemical and physical principles. A truism? In some sense, yes. In reality, far from trivial to understand how they they make use of the physical constraints. There are new experimental approaches to **quantify** (a) single molecule and (b) collective properties of these molecular “mecano”. The spectrum is very large and extends from biochemistry to developmental biology ! Here we introduce these experimental techniques through biological examples.

Outline of (general) physical questions

- 1 There is a coupling between cells and their environment : How to control the cell environment to control the function?
- 2 How do cell operate effectively given physical constraints? Principles beyond self-organization
- 3 How different networks operate, self-repair and interact?

Why now?

- 1 1800-1950 Physiology (muscle, nerve, sensory system). Genetic information.
- 2 First wave : 1950-1970 x-ray cristallography (protein structures), neutron scattering ; electron microscopy (supramolecular assembly)
- 3 Last wave (1980 - ?)
 - 1 New microscopies. Fluorescence, super-resolution microscopies (dynamics within the cell)
 - 2 High throuhout methods (genome, proteome, interactome)
 - 3 Quantitative Biology. Computation (quantitative modelling)
 - 4 Nanotechnology (single molecule manipulation)
 - 5 Hard x-rays scattering

Mechanical forces and molecular bonds

One of the key property of living system is that molecular mechanism leads to signal processing (signal transduction or cell signaling). Energy supply (there is no order without work) and biochemical interactions both regulate the protein networks. Regulating intramolecular interactions is therefore crucial and probing these interactions lead to new insights.

The 4 molecular plans of living systems

There are 4 molecular basic plans used to construct cell nano-machines. Lead to different types of (dynamic) self-assembled system with different properties :

- 1 Nucleic acids (molecular biology)
- 2 Proteins (cell biology)
- 3 Lipids (biochemistry)
- 4 Other (ex. sugar, polyglycans, glycocalyx, collagen, fibronectin)



Overview

Recent technological development have provided new tools to understand chemical bonds and energy supply at the scale of one molecule. This tools generally apply a force to a molecular bond. We start by reviewing the forces at the scale of the cell and give examples where biochemistry is stress dependent. Next we describes these methods and how they are applied.

Forces at the scale of the cell

Covalent bonding

The strongest forces encountered at the molecular scale are those required to break the covalent bond. Covalent bonds occur between two atoms when they form a molecule. Chemists measure the strength of a chemical bond by the amount of energy E_b involved in this binding. Strictly speaking this energy is not a force, but both are related by a length-scale l :

$$E_b = F_b \cdot l \quad (1)$$

- ① The typical energy of a covalent bond is 1 electron-Volt with $1 \text{ eV} = 1.6 \cdot 10^{-19}$ Joules, or 24 kcalories/mole.
- ② The typical distance l over which the bond persists is typically 0.1 nanometer. Thus the force required to break a covalent bond is on the order of $1 \text{ eV} / 0.1 \text{ nm} \simeq 1600 \text{ pN}$.

Covalent forces I: Primary structure

Primary structure of proteins. For nucleic acids : Pair base interaction by weak hydrogen bonding

- ① ADN (Adenin, **Thyrosin**, Guanin, Cytosin)
- ② ARN (Adenin, **Uracil**, Guanin, Cytosin)

Covalent forces II: Post-translational modifications

Covalent change of signal-transducing protein induced by **energy-supplying** reactions.

- 1 Oxidations and Nitrosylations of thiol group
- 2 Phosphorylation catalysed by protein kinases
- 3 Ubiquitylation catalyzed by ubiquitin transferases
- 4 Acetylation catalyzed by acetyl transferases
- 5 Partial proteolysis

What's the use ?

- 1 Reverse reactions are catalyzed by enzymes. The activity of the kinase depends on the signal.
- 2 Proteins is temporally frozen in a state which allows **not-covalent** interaction with an other protein. No change in conformation, no interaction with the partner !
- 3 Important for cellular signal processing. Cellular signal processing is an entropy lowering process and needs energy input !
- 4 ATP and GTP hydrolysis are **not** covalent post-translational modifications.

Not-covalent bonding

- 1 Hydrogen bonding
- 2 Van des Waals interaction (dipole induced - dipole induced interaction)
- 3 Protein-protein interaction

Thermal Forces

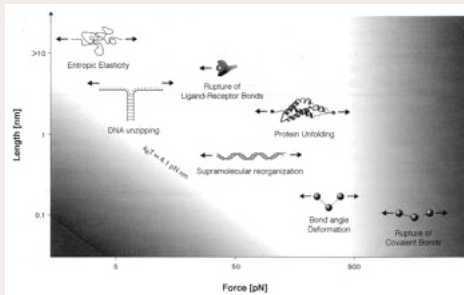
The forces beyond all entropic effects

- 1 Langevin forces (Brownian movement)
- 2 Force necessary to stretch a polymer (entropic forces)

Useful unit

$$1 k_B T = 4.1 \text{ pN} \cdot \text{nM} \quad (2)$$

Forces are used to probe chemical bonds



Conclusion

Mechanical forces have compatible strength with chemical forces (and thermal forces).

Forces at the scale of the cell

Type of Force	Example	Rupture Force
Breaking of a covalent bond	C-C	1600 pN
Breaking of a noncovalent bond	Biotin/streptavidin	160 pN
Breaking of a weak bond	Hydrogen bond	4 pN
Langevin force	on E-coli	0.01 pN (1s)
Stretching dsDNA	to 50 % relative extension	0.1 pN
Developed by a molecular motor	Kinesin walking on microtubule	5 pN

Remark

It was foreseen that mechanical forces at the scale of the cell are obviously weak. Stopping our discussion here would be very superficial and there is a second level of description. Mechanical properties contribute to cellular organization from molecular to tissues level. We introduce two examples where these mechanical properties play an important role : 1) Cell-extracellular matrix interaction 2) Cell Wall elasticity in plants.

Local force and geometry sensing regulate cell function

Mechanotransduction

Conformation-dependent biochemical reactions (read-out) that activate intracellular signals (amplification); for example, G-protein activation, Tyr-kinase activation, lipase activation, kinase cascades or Ca^{2+} release.

Examples

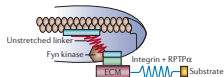
- 1 Exposure of cryptic sequence by unfolding modules.
- 2 Force regulation of protein activity.
- 3 Mechano-sensitive ion channels.

Example of mechanical Forces coupled to biochemistry : Cell adhesion

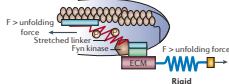
Mechanical forces are compatible with internal forces which trigger biochemical reactions.

Initial adherence cannot resist to mechanical forces larger than 2pN. Typical time scale is 1mn. **Stage 2** : If the substrate is sufficiently rigid, new proteins are recruited (vinculin). This will reinforce the mechanical connection to 5nN. **Stage 3**: Fusion and maturation of the focal complexes. The mechanical resistance to an external stress is now increased by a factor 7.

a Rigid or soft surface, resting state



b Rigid surface, linker phosphorylated



c Soft surface, linker not phosphorylated

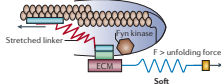


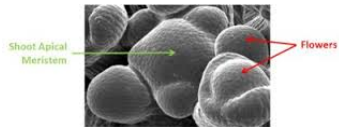
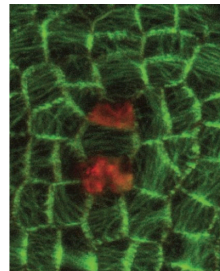
Figure 4 | **Mechanisms of rigidity sensing.** These panels illustrate the position-dependent mechanism of rigidity sensing. **a** | The crucial feature in such a model is that the enzyme, Fyn, and the substrate to be activated by stretch (kinase and substrate in this example) move relative to one another by actin rearward transport. **b** | If the surface is hard, the components would be close enough for modification to occur (causing small displacement). **c** | If the surface is soft, then enzyme and substrate would be separated before force could activate the reaction (in this case phosphorylation of the linker: causing large displacement). Contractile activity in a soft tissue could make it seem hard, because an external pull on the integrin before it moves significantly will cause unfolding while the substrate and enzyme are still close together. A time-dependent mechanism would be similar except that activity, rather than position, would be force-dependent with a biphasic response. The velocity of the cytoskeleton contraction would define the time window of the relevant activity in that model. We feel that position-dependent mechanisms are more robust. ECM, extracellular matrix; F, applied force; RPTP α , receptor-like protein tyrosine phosphatase- α . Figure modified, with permission, from REF. 50 © (2006) The Biophysical Society.

Cell wall stiffness in plants : Meristems refer to a group of undifferentiated dividing cells that are responsible for the formation of plant organs. Floral meristems are a group of dividing cells that give rise to flowers.

Developmental Patterning by Mechanical Signals in *Arabidopsis*

Olivier Hamant,^{1,2*} Marcus G. Heister,^{3*} Henrik Jönsson,^{1*} Pawel Krupinski,⁴ Magalie Uyttewaal,^{1,2} Plamen Bokov,^{5,6} Francis Corson,⁵ Patrik Sahlin,⁴ Arezki Boudaoud,⁵ Elliot M. Meyerowitz,^{2†} Yves Couder,^{4†} Jan Traas^{1,2†}

A central question in developmental biology is whether and how mechanical forces serve as cues for cellular behavior and thereby regulate morphogenesis. We found that morphogenesis at the *Arabidopsis* shoot apex depends on the microtubule cytoskeleton, which in turn is regulated by mechanical stress. A combination of experiments and modeling shows that a feedback loop encompassing tissue morphology, stress patterns, and microtubule-mediated cellular properties is sufficient to account for the coordinated patterns of microtubule arrays observed in epidermal cells, as well as for patterns of apical morphogenesis.



Showing stress. The shoot apical meristem of the plant *A. thaliana* is shown after two cells (red) have been ablated by laser treatment. The concentric pattern of microtubules (green) surrounding the ablated cells resembles the pattern of maximal stresses predicted by mechanical modeling and simulation of cell ablation.

Système	Taille	Vitesse	Force	Fonction et intérêt
Polymères	$> 10 \text{ nm}$		$2 - 3 \text{ pN}$	Élasticité entropique
ADN	2 nm		$2 - 3 \text{ pN}$	Séparation deux doubles brins
Ligand-récepteur	10 nm		50 pN	Liaison chimique non-covalente
Assemblages supramoléculaires	10 nm		100 pN	Organisation fonctionnelle
Protéines	20 nm		300 pN	Repliment des protéines
Macromolécules	0.5 nm		$> 600 \text{ pN}$	Liaison covalente
Moteurs moléculaires	Taille du moteur			
(a) Myosine (actine)	20 nm	$3 \cdot 10^{2-4} \text{ nm s}^{-1}$	10 pN	Contraction et transport
(b) Kinésine (microtubule)	6 nm	800 nm s^{-1}	6 pN	Mitose
(c) RNA polymerase	15 nm	5 nm s^{-1}	25 pN	Transcription
(d) Flagelle	45 nm	300 rps	500 pN nm	Propulsion
(e) F_1 -ATPase		8 rps	100 pN nm	Synthèse de l'ATP

Mechanical experiments on single molecules

Methods in single molecule experiments

- 1 Micropipettes (see ionic channels)
- 2 Atomic Force Microscopy
- 3 Optical tweezers
- 4 Magnetic trap
- 5 Biomembrane force probe
- 6 Super resolution microscopies + Optogenetics

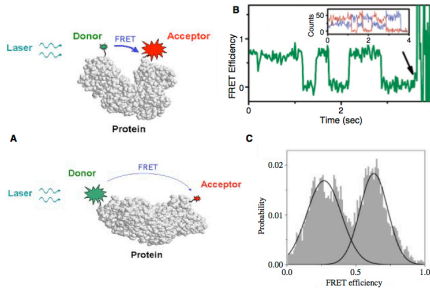
Properties

Typical experiments in biochemistry average over 10^9 molecules. The probability distribution of a property is more interesting than the average property, since it contains more information. Measuring ensemble averaged properties can miss important features. For example :

- 1 Experiments on a mixture of two populations indexed by ± 1 lead to 0. It is impossible to know whether the molecules are indexed by 0 or by ± 1 .
- 2 If a molecule has two possible states, the average over the two states misses the property of each state.

Single molecule experiments : How to test statistical physics with biomolecules

- 1 Single molecule experiments measure the whole distribution of molecular properties. Although, there are many methodologies, they all apply a mechanical force to a supra-molecular complex.
- 2 They are able to characterize the kinetics of bimolecular interaction et detect molecular intermediates
- 3 They are able to detect conformational changes of proteins in interaction



Probability of being in state $i = 1, 2$

$$P(E_i) = \frac{e^{-\beta E_i}}{e^{-\beta E_1} + e^{-\beta E_2}} \quad (3)$$

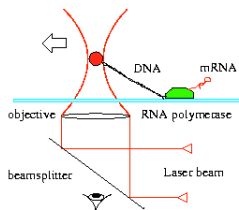
with

$$\beta = \frac{1}{k_B T} \quad (4)$$

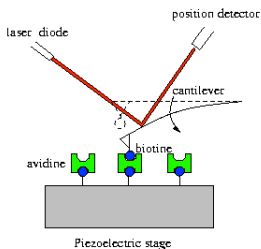
Efficiency \propto distance⁶

Optical Trap

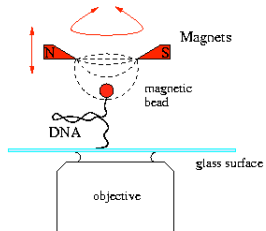
(C)



AFM

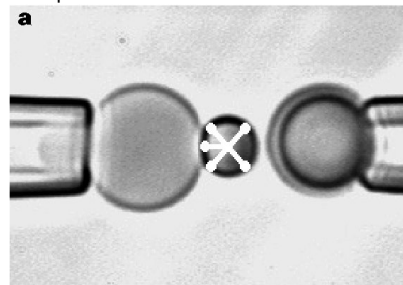


Magnetic tweezers



Biomembrane

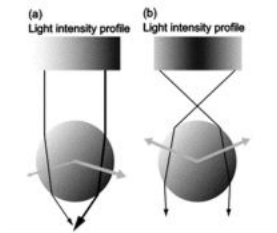
force probe



Optical tweezers

Dielectric particles are attracted along the gradient to the region of strongest electric field. Two cases : Mie or Rayleigh limit

$$\lambda \gg R \text{ or } \lambda \ll R? \quad (5)$$



The momentum transfer to the bead is greater in the regions of large intensity field. Displacement can be measured to an accuracy of 1 nm using a photodiode detector.

In the other limit where $\lambda \ll R$ (Rayleigh's regime) the bead is approximated as a dipole. If I_0 is the intensity

$$\mathbf{F}_{\perp} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0 \quad (6)$$

where α is the polarisability ($m = n_p/n_m$)

$$\alpha = n_m^2 R^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (7)$$

Magnetic tweezer : Make use of Brownian motion, see next chapter

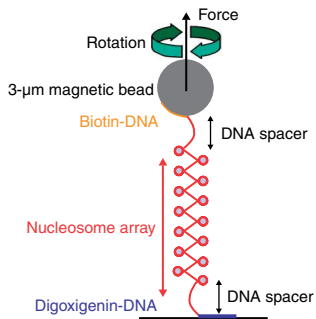
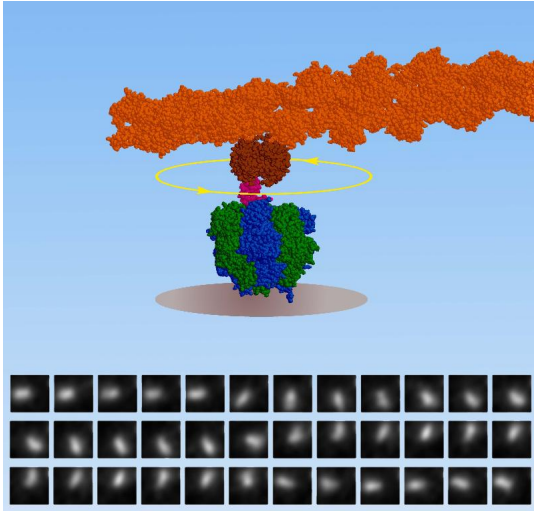


Figure 1 Schematic of the experiment. A single nucleosome array (~ 7.5 kbp), sandwiched between two naked DNA spacers (~ 600 bp each), is linked to a coated surface and to a magnetic bead. A pair of magnets placed above this molecule exerts controlled torsional and extensional constraints⁸.

Exemple of a rotary motor : the F1-ATPAase



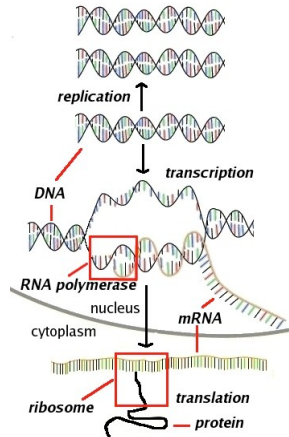
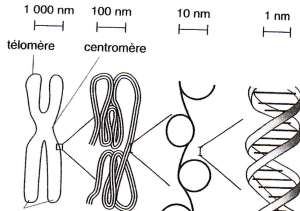
In 1997, the group of K. Kinosita attached the F1-ATPase unit to a glass coverslip while linking the central part of the enzyme to a rigid, fluorescently labelled protein rod. Upon adding the ATP chemical to the solution, these researchers observed the fluorescent rod spinning furiously. This simple experiment demonstrated that this tiny enzyme, only 10 nm across, is indeed the smallest known rotary motor spinning in all of our cells 8000 rpm and burning the ATP fuel with nearly 100% efficiency!

Nucleic acids

Molecular Approach : DNA and RNA

- ① DNA : storehouse for genetic information
- ② mRNA : temporary carrier of this information

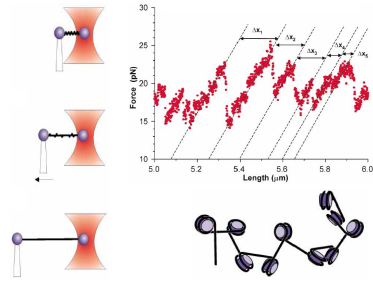
Small chemical differences (the sugar has an extra oxygen and the thymine base is replaced by uracil). Not a big deal, but the oxygen makes RNA a little bit less stable than DNA.



The force extension curve of chromatin can be measured using optical tweezers

DNA compaction

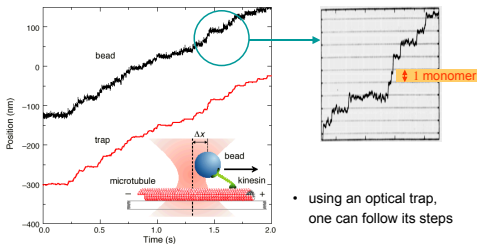
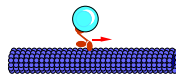
We have $R \ll a\sqrt{N}$ (R.W.) in nuclei. DNA compaction is necessary (histones) and is certainly dynamic to allow protein expression.



Each peak corresponds to a nucleosome core particle popping out.

Micro-manipulation of motor proteins

The motor protein kinesin walks along microtubules



Transcription against force, Gelles, 1995

What is the force produced by a single enzyme (RNA polymerase) along a DNA template?

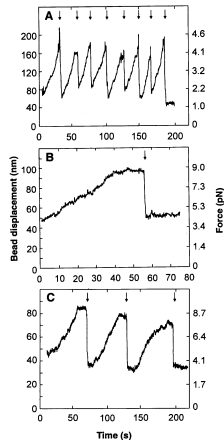
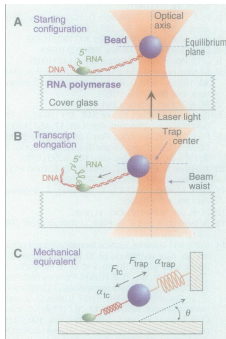


Fig. 2. Time courses for displacement from the trap center and the corresponding optical force applied to single beads driven by translocation of an RNA polymerase molecule along DNA. Force scales (right-hand axes) are nonlinear (14). The zero of the time axis is arbitrary. Reactions were conducted at 1 mM NTPs with 0.001 mM (**A**) or 1 mM (**B** and **C**) PP, at laser powers of 25 (**A**), 82 (**B**), or 99 (**C**) mW. Vertical arrows designate times at which the trap was repositioned to reduce the optical force. An irreversible stall is shown in (**B**).

Micro-manipulation on proteins

Examples

- 1 Chemical Enzymes - Chemical reaction networks
- 2 Structures - Cytoskeleton (mechanics and signalization)
- 3 Molecular motors

What is a protein ?

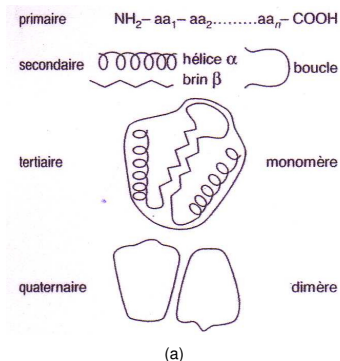


FIG.: Schéma des niveaux hiérarchiques impliquant différentes structures pour une protéine typique. La structure tertiaire protège un ion du milieu extérieur. Un changement de conformation de cette structure expose cet ion au solvant, ce qui peut rendre la protéine active du point de vue de la réaction chimique.

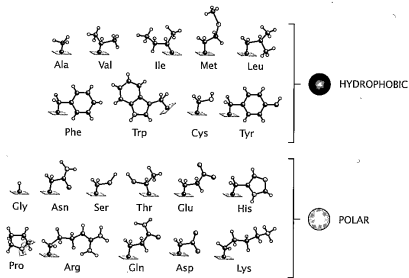
1 gray!!20gray!!5

Mouvement	Échelle de temps caractéristique (en unité logarithmique)
Vibration moléculaire	-14 à -13
Transfert d'un proton	-12
Lien hydrogène	-12
Vibration élastique d'une région globulaire	-12, -11
Flexion d'une charnière à l'interface de deux domaines	-11 à -7
Réarrangement des molécules d'eau	-8
Formation Hélice-Pelote	-8 à -7

General properties : The hydrophobic (H) Polar (P) problem

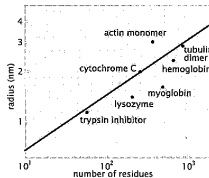
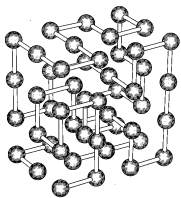
- 1 A protein is NOT a (homo)polymer. It is an heteropolymer made of aminoacids (20) can be either **hydrophobic** (H) or **polar** (P).
- 2 Hydrophobic force plays a prominent role in protein folding (HP model)
- 3 HP problem : Given a HP sequence, which of the possible structures minimize the hydrophobic interaction energy?
- 4 Protein-like sequences fold into a unique compact structure (with other non-absolute minima, important). Other structure with degenerate minima are not protein-like
- 5 Proteins are therefore compact and globular structures (but not spherical)
- 6 Proteins can change their conformation under (de)phosphorylation or upon binding a ligand (allosteric activation).

A



B

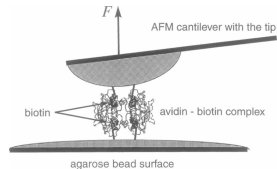
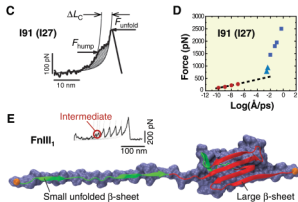
Compact Polymer conformation



C

Scaling of protein size as a function of the number of amino acid residues. The slope is 1/3 (space-filling packing)

Pulling a multi-modular protein with an AFM : Unfolding Titin using AFM cantilever tip



Conclusion

- ① A peak in the force-distance curve corresponds to unfolding of a domain
- ② The characteristic force at which the domain unfolds depends on the **loading rate**. This is due to thermal fluctuations and will be studied in the chapter on Brownian motion.

Fluorescence microscopies for cellular imaging

Traditional techniques (biochemical, genetic, structural) provide static, snapshot view of cells. Imaging the dynamics of the cell functions adds an extra dimension and provide new insights.

New Optical methods (1985):

- 1 Fluorescence microscopy : Fluorescent probes
- 2 Fluorescence microscopy : Diffraction limit
- 3 Large Field microscopy : evanescent wave microscopy
- 4 Confocal microscopy (Frap, FCS, Fret)
- 5 Super-resolution microscopy (going beyond the diffraction limit)

GFP : the green revolution

Back to 1994. **Fluorescent protein** (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* can be used as a marker for protein localization and expression in living bacteria and worm cells (Nobel prize in chemistry in 2008). Today, fluorescent proteins are available in many colors and some of them can photo-activated (PA-GFP) or photoconverted (Kaede).

- 1 238 amino-acids, absorbs blue light ($\lambda = 480 \text{ nm}$) and emits green light ($\lambda = 510 \text{ nm}$)
- 2 GFP-tagged proteins can be directly expressed by the cell.
- 3 Sensitive to photo-destruction
- 4 Inorganic particles (semi-conductor nano-cristal) are much less sensitive.

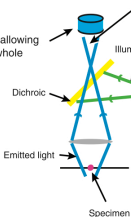


Note that the chromophore is in the center (thus very stable)

Widefield imaging

Widefield

Detector: usually CCD allowing fast acquisition of the whole field simultaneously.



Widefield microscopes collect light emitted from the entire depth of the specimen. Acquisition is fast.

Light source: usually mercury or xenon lamp, high flexibility with many excitation and emission wavelengths possible when used in combination with appropriate filter sets. Excitation switching is fast using filter wheels or a monochromator.

Widefield systems provide a highly flexible system for live cell imaging with fast acquisition and flexible excitation at low cost. Photobleaching experiments are not practical.

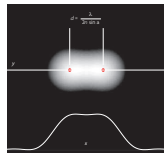
A

microscope is characterized by two parameters :

- 1 Magnification
- 2 Numerical aperture

Numerical aperture fixes :

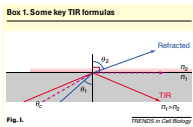
- 1 The depth of field (depth of the specimen clearly in focus)
- 2 The spatial resolution (Abbé's law)



Blurred by diffraction, the image of two point objects is not as just about be resolved at distance d . Line profile function quantifies the blurring along the direction of separation. Diagram courtesy of S. Hell, MPI Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany.

To avoid noise coming from out of plane illumination : Evanescent waves microscopies

Total Internal Reflection is based on Snell's laws: Consider light traveling in a dense medium (refractive index n_1) and striking a less dense medium (refractive index $n_2 < n_1$) beyond a critical angle, the light will undergo TIR. The critical angle θ_c depends on n_2/n_1 .



Critical angle:

At the critical angle, θ_c , $\theta_2 = 90^\circ$; $\sin 90^\circ = 1$;

$$n_1 \sin \theta_c = n_2$$

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$$

$$\text{If } n_1 = 1.515 \text{ and } n_2 = 1.36, \theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{1.36}{1.515}\right) = 63.85^\circ$$

Snell's law:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

θ = angle of incidence, n = refractive index

However, when light is reflected, there is an evanescent wave which slightly penetrates the medium due to "near field effect".

The evanescent wave makes an optical slice which allows to excite chromophores at a depth < 100 nm. Good Signal/Noise ratio !

Evanescent field:

$$I_z = I_0 \exp^{-z/d_p}$$

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}$$

I = intensity, z = distance, λ = wavelength,
 d_p = penetration depth

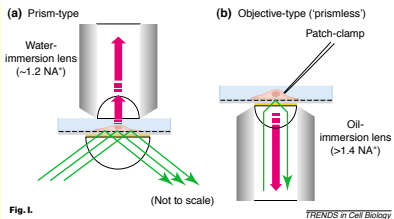
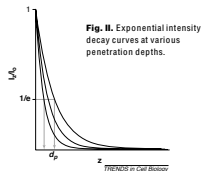


Fig. I.

TRENDS in Cell Biology

Light microscopy at the limit

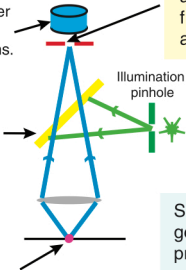
Confocal microscopy has been one of the milestones of the last century (see also bi-photon microscopy: excite a chromophore from two photons. Longer wavelength excitation, deeper penetration depth and reduce photobleaching)

Scanning Confocal

Detector: usually a photomultiplier which has reduced sensitivity compared to CCD-based systems.

Some recent systems eliminate the need for a dichroic by using an acousto-optical beam-splitter instead. This increases light throughput and flexibility of detection.

Scanning of illumination beam across sample limits acquisition speed. Provides flexibility of illumination area needed for photobleaching experiments.



Scanning confocal microscopes include a pinhole to eliminate out-of-focus light from the detector. Scanning speeds limit acquisition rates.

Laser illumination: excitation wavelengths limited to laser lines available. Excitation beam switching is slow, restricting speed of acquisition.

Scanning confocal systems are now a general tool for live cell imaging. Multiple probes can be imaged simultaneously, and the ability to restrict illumination to small regions enables photobleaching experiments such as FRAP. Increasing complexity of hardware increases cost.

Confocal microscopes can be used in different modes : Scanning of illumination beam or fixed illumination beam

- 1 **Fluorescence Correlation Microscopy (FCS)** detects stochastic movements of fluorophores in and out of a focused laser beam. It is used to measure the kinetics of biological reactions, diffusion and flow. Today, Fluorescence Cross-Correlation Microscopy (FCCS) measures protein interaction.
- 2 **Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)** is a robust technique which allows to measure the recovery curve of photobleached samples by lateral diffusion. It is used to study traffic among the cell compartments.

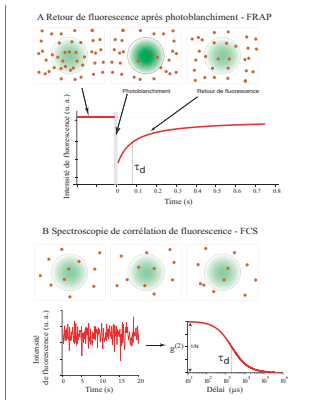


Figure 1 – Principes du FRAP et de la FCS. Ces deux méthodes utilisent un laser pour éclairer une petite région de la membrane (en vert) et collectent la fluorescence de molécules marquées (en rouge) à l'aide d'un montage confocal. D'après Marguet *et al.* 2006. Dynamics in the plasma membrane - How to conciliate fluidity and order. *Embo. J.*, sous presse.

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (8)$$

If simple brownian diffusion :

$$g^2(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_d} \quad (9)$$

Where N is the number of molecules. We have

$$\tau_d = \frac{w^2}{4D} \quad (10)$$

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Excitation energy can be transferred from a donor fluorophore to an acceptor chromophore in **close** proximity with an efficiency scaling as

$$e \propto 1/d^6 \quad (11)$$

→ suited to imaging protein-protein interaction.

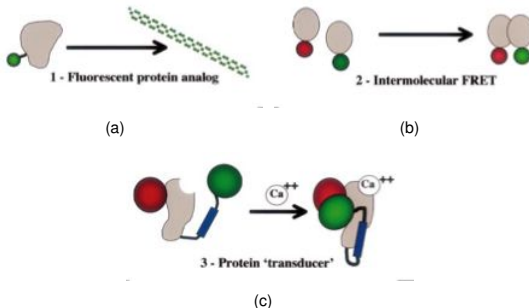


FIG.: Les différentes stratégies d'utilisation du FRET [?]. En (a), les protéines étiquetées par la G.F.P. peuvent être introduites dans la cellule, ce qui permet de les suivre en temps réel. En (b) on utilise le transfert d'énergie entre les deux molécules pour savoir si elles interagissent. En (c) un ligand et un récepteur se lie en présence de calcium. Le FRET est alors utilisé pour connaître la concentration de ligands et récepteurs qui sont liés.

Super-resolution Microscopy

Recall : Due to diffraction limit, one cannot discern objects closer together than a distance

$$d = \lambda / (2n \sin \alpha) \quad (12)$$

where $n \sin \alpha$ is the numerical aperture and λ is the wavelength. Typically, $d = 200nm$ in diameter and $400 - 700nm$ in axial length.

Let us assume that 2 tiny fluorescent objects are $D < 200$ apart.

- 1 If they possess different colors, separation is straightforward : Use a filter.
However, there is no way to put different color stickers on each of them.
- 2 To distinguish the objects, the trick is to switch their signal on and off so that they are seen consecutively.

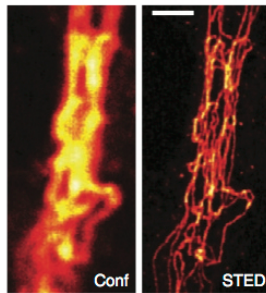
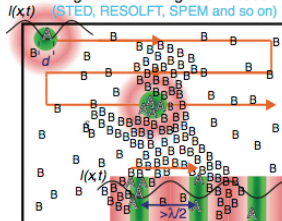
This is exactly how new techniques resolve objects that are closer together than the diffraction limit. There are a number of methods (4Pi microscopy, Sted, Palm, Storm) which work by switching their fluorophores on and off sequentially in time.

In summary, you need a fluorescent molecule with two states : A fluorescent (on) state and a dark (off) state to represent the switch.

Switching distinguishes the objects, but to assemble an image, we need the coordinates. Two strategies are available:

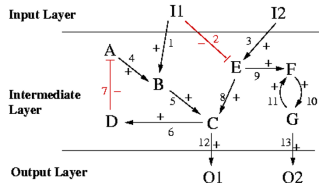
- 1 Either target the coordinates in the sample by using optical methods to define areas in the sample where the fluorophores must on or off (STED): The intensity of the laser beam $I(x,t)$ has a zero intensity point in space for doughnut-shaped beam. Shift the pattern $I(x,t)$, record the features sequentially in time and assemble the image.
- 2 Let the fluorophores go on and off stochastically and find out where these events happened (PALM, STORM).

Targeted switching and readout
(STED, RESOLFT, SPEM and so on)



Optogenetics

Control and monitor the activities of individual proteins in real-time using light activation of proteins. Evaluate the response of well-defined biochemical events at short time. Allow to interrogate cell signaling networks: Light-activate the input layer (eg. receptors) and understand how the output layer is activated. Test logical circuits:

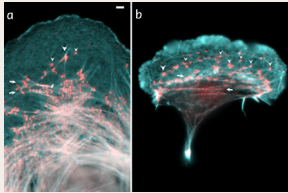


For useful links, see: <https://web.stanford.edu/group/dlab/optogenetics/>

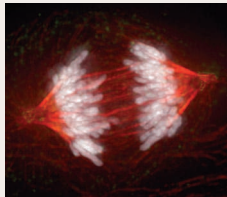
Conclusion

Fluorescence microscopy and the cytoskeletons

The actin cytoskeleton: ATPase



The microtubule cytoskeleton : GTPase



Chromosomes (white) segregated by microtubules (stained with anti-tubulin, (red)), illustrating the dynamics of mitosis that Inoue deduced from the birefringent observation of spindle fibres. Courtesy of Z. Yang and C. L. Rieder, Wadsworth Center, Albany, NY, USA.

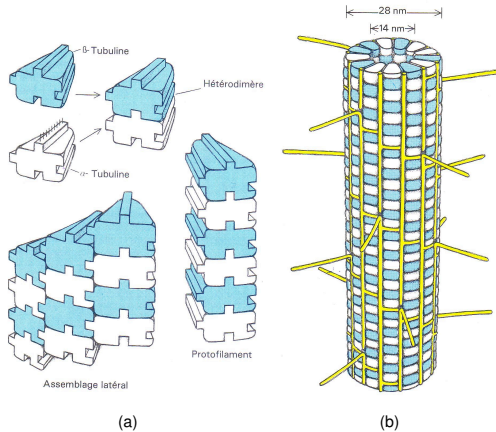
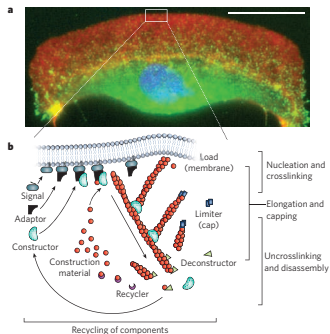


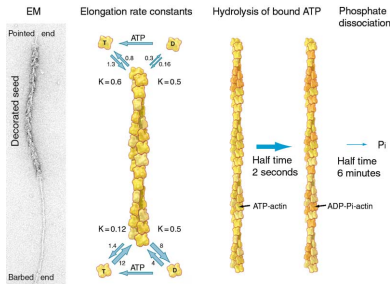
FIG.: Tubuline is a GTPase. Microtubules are **much more rigid** than actin filaments.

Cell motility involves subtle polymerization-depolymerization processes

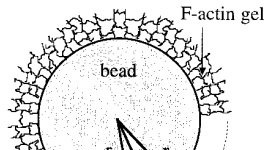
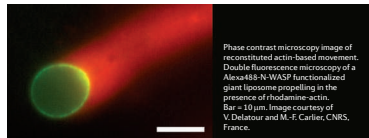


Artificial Motility : Mimicking Listeria

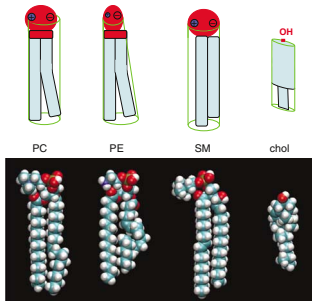
Actin is a dynamic polymer able to polymerize because of activation centers located near the membrane. Polymerization is an active phenomenon (needs ATP)



Today, reconstituted systems (here a vesicle coated with polymerizing centers) allow to study listeria like propulsion



Lipids: Molecular Approach



Structure des phospholipides usuels. La structure est plus ou moins cylindrique et a taille des têtes polaires varie en passant de PC (phosphatidylcholine), PE (phosphatidylethanolamine) dont la forme est plutôt conique, et SM (sphingolipid sphingomyelin) qui a une grande affinité pour le cholestérol (d'après Ref. [?]).

Fluid Mosaic model

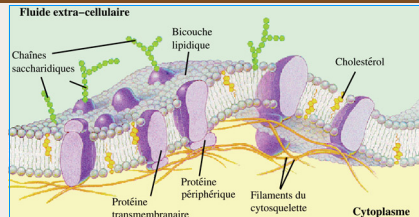


Figure 1 – Schéma de la membrane plasmique, avec ses composants évoqués dans le texte. La bicouche a une épaisseur de l'ordre de 5 nm. D'après Greg Geibel, http://sun.menloschool.org/~cweaver/cells/c/cell_membrane/.

Rafts

Existence of **rafts** (1988, Simons and Van Meer, micro-domains $\simeq 30$ nm): platform for signalization. Proven but origin ?

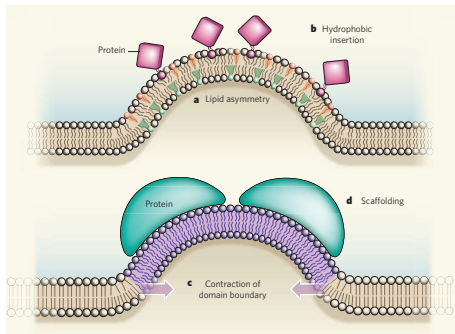


Figure 1 | Mechanisms of bending in lipid bilayers. **a**, Lipid asymmetry. This occurs when each monolayer is enriched with lipid molecules of different shapes (such as the orange and green molecules shown) and/or when one monolayer contains more lipid molecules than the other. **b**, Proteins cause membrane asymmetry by inserting their hydrophobic domains into one side of the bilayer. **c**, When bilayer matrices contain domains consisting of different lipid phases (such as the ordered (brown) and disordered (purple) regions shown), the boundaries between the domains tend to contract, causing the intervening region to bend. **d**, Finally, proteins bound to the bilayer can act as scaffolds that force curvature on the membrane. Yu *et al.*⁷ report a synthetic model of membranes in which both hydrophobic insertion and domain-boundary contraction bring about bending.

Courber la membrane requiert une énergie de l'ordre de $20 k_B T$. Ici mécanismes qui permettent de courber une membrane fluctuante pour faire des sphérules ou des tubes → systèmes reconstitués. There are now evidences that there are proteins which can **sense** the curvature (see Antony)

Physical constrains

- 1 Low Reynolds Number Fluid Mechanics
- 2 Thermal effect : Brownian motion

Life at low Reynolds number

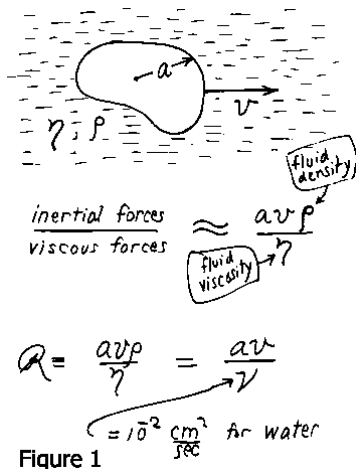


FIG.: Importance de la viscosité (prédictions \Rightarrow ordre de grandeur?!)

Ordres de grandeur

- $\eta_{\text{eau}} = 10^{-2} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- $R \simeq 10^{-2}$ sperm
- Sang $\simeq 10^2$ (aorte 10^3)
- Vous (et moi) 10^6
- Pétrolier $> 10^{10}$

Conclusion

Le mouvement du fluide n'a **rien** à voir avec notre expérience quotidienne. Inertie est totalement non pertinente. Nage est très majestueuse

What does represent the Reynolds number ?

Two regimes : either dominated by friction or by inertia

$$f_{cri} = \frac{\eta^2}{\rho} \quad (13)$$

Examples : from $4 \cdot 10^{-10} N$ to $0.03 N$

- 1 Air ($\rho = 1, \eta = 2 \cdot 10^{-5} Pas$)
- 2 Water (1000, 0.009)
- 3 Olive oil (900, 0.08)
- 4 Glycerine (1300, 1)
- 5 Corn Syrup (1000, 5).

Petit problème

Soit objet taille L , densité ρ soumis à F . À $t = 0$ on a $F = 0$, longueur d'arrêt?

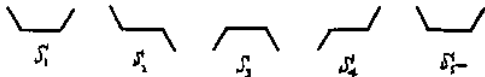
$$\frac{d^2x}{dt^2} - 6\pi \frac{\eta \rho_w L}{\rho_p L^3} \frac{dx}{dt} = 0$$

- Bactérie : \Rightarrow temps caractéristique $\mathcal{R} \times \frac{\text{taille}}{\text{vitesse}} \simeq 10^{-6}$ ($d < 1\text{\AA}$)
- Pétrolier 10^5 km (hum ... ne jamais écrire cette loi pour un objet macroscopique, car turbulence)

Navier-Stokes

$$\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} = \rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \rho (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = 0 \quad (14)$$

Conséquences : Le temps n'intervient pas de façon explicite et symétrie $t \rightarrow -t$. Les équations sont identiques si l'on reverse le signe du temps de tel sorte que des mouvements avant et arrière ont des effets strictement opposés. On ne peut pas nager avec un seul degré de liberté, car ce que l'on gagne sur un 1/2 cycle est perdu au cours du 1/2 cycle suivant. Il faut **2** degrés de liberté (2 bras !) et parcourir un cycle



The time-reversal properties of a dynamical law signal its dissipative character

- 1 Newton equations are invariant under the symmetry $t \rightarrow -t$. The trajectories are the same. Holds when inertia dominates.
- 2 Hydrodynamic equations are not. To get the reverse motion you need to change both t in $-t$ but also the sign of the force.

Diffusion versus mélange

- 1 Temps caractéristique de mélange à vitesse v sur une distance l : $\frac{l}{v}$
- 2 Temps caractéristique lié à la diffusion ($D \simeq 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$): $\frac{l^2}{D}$

Conséquence : le temps caractéristique lié à la diffusion est beaucoup plus petit que le temps caractéristique lié au mélange. Mélanger ne sert à rien, il suffit d'attendre pour manger. Pourquoi bougent-elles alors ?

Vesicles under shear flow (A. Viallat, M. Abkarian)

Near a wall (fluid is moving from left to right)

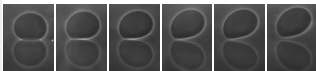


Figure 6: Unbinding of a vesicle in a shear flow. The lowest image is the reflection on the substrate. From left to right, each picture is taken at increasing shear rates: 0, 0.09, 0.14, 0.23, 0.32, 0.36 s^{-1} , $R=36$, $9 \mu m$, $\nu = 0.98$

Tankthreading (fluid is moving from left to right)

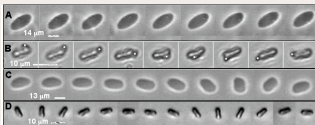


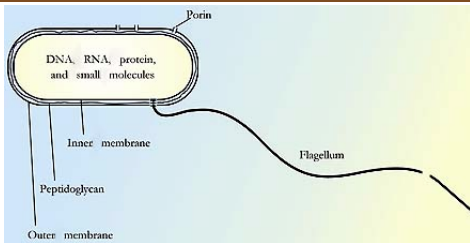
Figure 1 : Vesicles and red blood cells in shear flow. A : tanktreading vesicle, viscosity ratio $c = \eta_i/\eta_o = 1$; B : rotation of a bead (diameter 1 μm) stuck on the membrane of a tanktreading RBC with $c = 1/47$, shear rate : 6 s^{-1} ; C : tumbling vesicle with $c = 8$; D : tumbling RBC with $c = 1/47$, shear rate : 0.8 s^{-1}

Life at low Reynolds number : le rêve des nanotechnologues

De Howard Berg (Physics Today, janvier 2000)

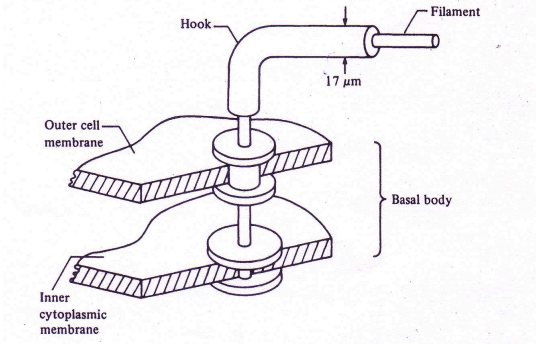
« *E. Coli*, a self-replicating object only a thousandth millimeter in size, can swim 35 diameters a second, taste simple chemical in its environment, and decide whether life is getting better or worse. »

- Vit dans nos estomacs (désolé ...sorry).
- 4286 gènes $\simeq 1 \mu m$ diamètre (H. sapiens $\simeq 25000$)
- Présence de flagelles (\Rightarrow Motiles sauf mutants sans flagelle)
- vitesse = 60 fois sa longueur en 1 seconde (\gg tous animaux macroscopiques !)



(a)

(b)



(c)

E. Coli

Lorsque la rotation des flagelles a lieu dans le sens horaire, les filaments forment une tresse et la rotation des flagelles entraîne un mouvement continu de la bactérie vers l'avant. Au contraire, lorsque les moteurs tournent dans le sens anti-horaire, les mouvements des flagelles ne sont plus coordonnés et la bactérie a un mouvement de culbute qui lui permet de changer de direction.

Le mouvement des moteurs est dû à un **flux** de protons de l'extérieur vers l'intérieur. Une rotation nécessite environ 1000 protons et celle-ci est assurée par un corps basal enfoui sous la membrane plasmique.

Tout comme les machines rotatives artificielles, le corps basal est constitué d'anneaux externes qui jouent le rôle de stator et qui permettent de stabiliser l'ensemble, alors que la rotation est assurée par des anneaux internes qui jouent le rôle de rotor. Une quarantaine de gènes sont requis pour l'assemblage de cette machine moléculaire.

Introduction au mouvement brownien et à ses applications

Bertrand Fourcade

19 mai 2014



FIG.: Maud Menten : a mathematical physicist
(driving erratically her T-Ford ...)

La présentation de ce cours sur le mouvement brownien est fortement inspirée de l'article de Bertrand Duplantier : Le mouvement brownien, « divers et ondayant », séminaire Poincaré, **1**, 155 - 212, 2005.

Plan

- 1 Introduction
- 2 Mouvement Brownien : un problème qui a la peau dure !
- 3 Équation de Langevin
- 4 Hypothèses sous-jacentes
- 5 Diffusion on membrane
- 6 Force spectroscopy
- 7 Application aux mesures extension-force de l'ADN

Introduction

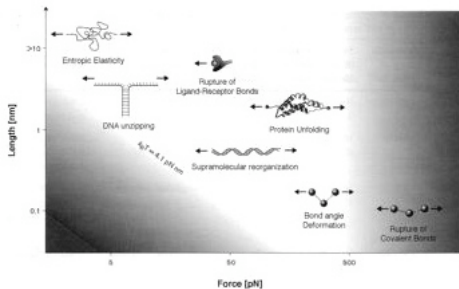
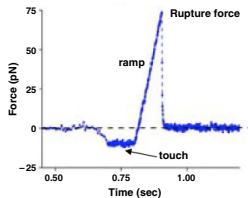
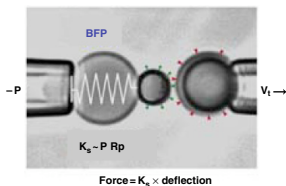


FIG.: Longueurs et forces caractéristiques à l'échelle du micron et en-dessous. Dans tout le domaine, les fluctuations browniennes sont très violentes.

Bio-membrane force probe : BFP

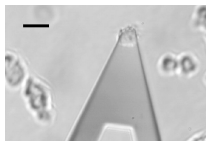
Mesure de la force de rupture d'une liaison ligand-récepteur.



Mesure de l'adhésion cellulaire



On déplace la pointe à
vitesse constante



Mesure des fluctuations de position de la pointe en fonction du temps.

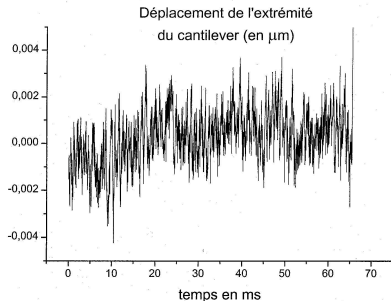


Figure 5: *Enregistrement du mouvement brownien, dans un liquide, de la pointe d'un microscope à force atomique. (Enregistrement fourni gracieusement par Pascal Silberzan, Institut Curie.)*

Mouvement Brownien : un problème qui a la peau dure

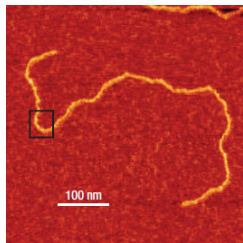
- Robert Brown (1773-1858) : « active molecules » (au sens du 18^e);
- Louis-Georges Gouy (1888) : mesures quantitatives (trajectoire sans tangente, plus vif dans fluide moins visqueux, plus actif à plus haute température;
- Albert Einstein (1905-1906) : Théorie générale du mouvement Brownien;
- Marian von Smoluchowski (1872-1917) : Introduction du calcul des probabilités en physique statistique;
- Louis Bachelier (1900) introduit le modèle de marche aléatoire dans sa thèse « la théorie de la spéculation »;
- Paul Langevin (1908), Jean Perrin (1913);
- Géométrie fine de la courbe brownienne: Paul Lévy (1886-1971), B. Mandelbrot (1982, conjecture 4/3 sur dimension fractale , B. Duplantier 1988), Wendelin Werner (Field, 2006) (voir la « passante du Sans-Souci » avec Romy Schneider).

- S. Condamin et al, *First-passage times in complex scale-invariant media* , Nature, 450, 77, 2007.



RAYMOND DANCHON présente
ROMY SCHNEIDER - MICHEL PICCOLI
LA PASSANTE DU SANS-SOUCI - UN FILM DE JACQUES ROUFFIO
Scénario et adaptation de JACQUES ROUFFIO et JACQUES KRISNER - Montage de JACQUES KRISNER
Musique de HENRI GOREAU - Direction artistique de DOMINIQUE LABOURER - Gérard KLEN - MATHIEU CARRERE
Jacques MARTIN - YVES ROBERT - JACQUES MARTIN - JACQUES MARTIN - JACQUES MARTIN
C'est un plaisir de présenter à Paris "LA PASSANTE DU SANS-SOUCI" de Jacques Rouffio
C'est un plaisir de présenter à Paris "LA PASSANTE DU SANS-SOUCI" de Jacques Rouffio

Réalisation expérimentale



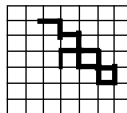
Wiggins, Nature Nanotechnology, 2006

- 1 High resolution atomic force microscopy.
- 2 2743 bp DNA double stranded DNA adsorbed on a surface.
- 3 Only two-dimensional movement possible.

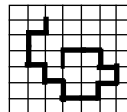
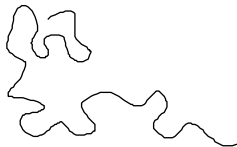
A random walk can be easily constructed on a lattice (with lattice spacing a)

Two universality classes with different properties :

- 1 Random Walks which can have self intersection (random trajectory of a particle)



- 2 Self avoiding random walk with self intersection (Polymer conformation)



Emergent properties

In both cases, with N monomers or steps :

$$\langle \mathbf{R} \rangle = \left\langle \sum_i^N \mathbf{r}_i \right\rangle = 0 \quad (1)$$

where $\langle \dots \rangle$ means "averaged over all conformations". What is $\langle \mathbf{R}^2 \rangle$?

- 1 If the random walk can be self intersecting, the central limit theorem tells us that \mathbf{R} is a gaussian variable. Thus

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = (\text{some constant}) N^{2\nu} \text{ with } \nu = 1/2 \quad (2)$$

Where the constant depends on a lot of things (square or triangular lattice) but where the exponent ν is universal (in particular independent of the dimension d of the space)

- 2 For a self-avoiding random walk $\langle \mathbf{R}^2 \rangle$ is larger and depends on the dimension d for $d \leq 4$, but not on d when $d \geq 4$.

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle = (\text{some constant}) N^{2\nu} \text{ with } \nu = 3/(d+2) \quad (3)$$

N.B. When a protein changes conformation, it diffuses in **configuration space**. Because of the very large number of degrees of freedom, the configuration space can be very large and has a dimension larger than 3!

Polymers (random coils) and bio-polymers

Distingo

- 1 Entropic polymers (soft matter) are experiment realizations of (self-avoiding) random walks. Entropic polymer have no elasticity and they change conformation because of entropic reasons.
- 2 Biopolymers (DNA, actin, microtubules etc) are stiff polymers where elasticity (bending, twisting) play an essential role.

Here : First, random walk problem

- 1 Fundamental problem in statistical physics : has emergent properties (macroscopic, large scale, independent of the nature of the polymer etc.)
- 2 On the large scale limit (many monomers) : the evolution is described by the diffusion equation. This a also an emergent properties. The diffusion equation does not apply to polymers with only a few numbers of segments. However, it applies if the number of segments $N \rightarrow \infty$.
- 3 There is a fundamental connection between the random walk problem and Boltzmann's statistics which describe objects in thermal equilibrium with a thermal bath.

Ransom walk problem and diffusion equation

In the continuum limit of long length and time scales, simple behavior emerges from the ensemble of irregular, jagged random walks. They are described by the diffusion equation :

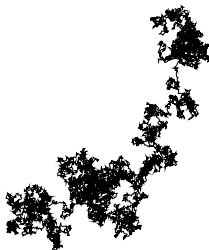


Figure 1: Aspect du mouvement brownien décrit par le centre de gravité d'une particule de pollen en suspension.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = D \nabla^2 \rho \quad (4)$$

where $\rho(\mathbf{r}, t)$ is the density. This equation applies if and only if the particle is not subjected to a force (i.e. without potential).

New mathematical problem : La frontière d'un mouvement brownien est une courbe brownienne **auto-évitante**.

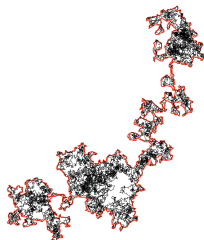
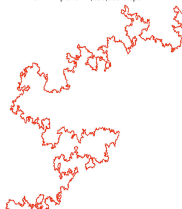


Figure 12: *Frontière ou enveloppe extérieure d'un chemin brownien plan.*

SAW in plane - 1,000,000 steps



Current and external force

As the particles moves, they are never created nor destroyed : they are **locally** conserved. We write the evolution law in terms of a current of particle passing through x

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = - \frac{\partial J_{\text{diffusion}}}{\partial x} \quad (5)$$

which says that the only way that things can change is through the flow of "stuff". Without force, we say the local current is proportional to the local gradient in density

$$J_{\text{diffusion}} = -D \frac{\partial \rho}{\partial x} \quad (6)$$

so that

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = D \nabla^2 \rho \quad (7)$$

In an external force F , the total current is the sum of a diffusion term and a drift term

$$J_{\text{total}} = -D \frac{\partial \rho}{\partial x} - \gamma \rho F \quad (8)$$

where the last term is the drift term (current or velocity proportional to the force)

Boltzmann's distribution follows from the diffusion equation

Assume that the force derive from a potential $U(x)$, with $F = -dU/dx$. From

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\frac{\partial J_{\text{total}}}{\partial x} \quad (9)$$

we look for stationary solutions (i.e. independent of time): $\partial \rho / \partial t = 0$. The only solution is (please check)

$$\rho(\mathbf{r}) = A \exp\left[-\frac{\gamma}{D} U(r)\right] \quad (10)$$

where A is a constant (that can be determined if $U(r)$ is known, since we have a conserved number of particles).

This a Boltzmann's distribution! In fact, γ/D is only a parameter. We can define the temperature as

$$\frac{\gamma}{D} = \frac{1}{k_B T} \quad (11)$$

and we rewrite

$$\rho(\mathbf{r}) = A \exp[-U(r)/k_B T] \quad (12)$$

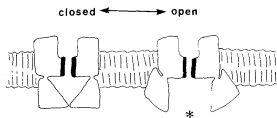
Boltzmann's distribution : two-states model for ion channels

The probability of finding the system in state with an energy E is proportional to the Boltzmann's weight

$$p(E) = \exp[-E/k_B T]/Z \quad (13)$$

where Z is a normalization constant.

EXAMPLE 1 : Ion channels provide an elementary example of a two-states machine.

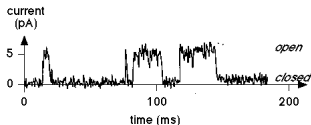


$$p_{open} = e^{-E_{open}/k_B T} / Z \quad (14)$$

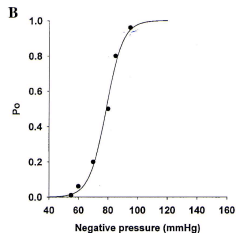
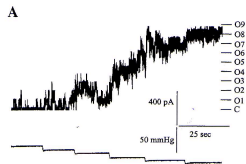
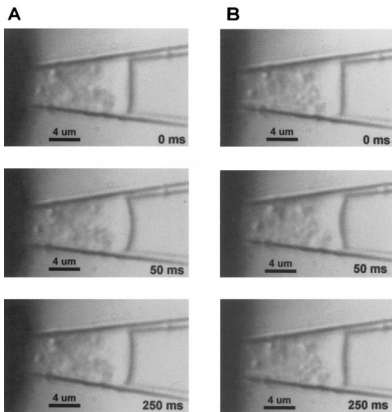
$$p_{closed} = e^{-E_{closed}/k_B T} / Z \quad (15)$$

What is Z ?

Patch Clamp

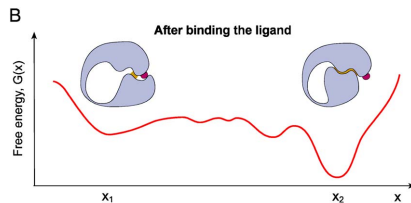
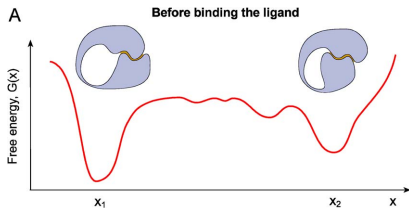


Mechano-sensitive ion channels



Boltzmann distribution as a function of the pressure inside the micropipette.

Phosphorylation or allosteric activation can change the energy balance between active and inactive states



The variable x is some kind of coordinate which allows to distinguish between the two states. In statistical mechanics, x is referred to as an order parameter.

Équation de Langevin

On reprend l'argument original de Langevin.

Point de départ

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{1}{2} \frac{RT}{\mathcal{N}} \quad (16)$$

où \mathcal{N} est le nombre d'Avogadro

$$k_B = \frac{R}{\mathcal{N}} = 1,381 \times 10^{-23} \text{JK}^{-1} \quad (17)$$

est la constante de Boltzmann (due à Planck, 1900)

Soit bille de rayon a dans fluide de viscosité cinématique η (bain de chaleur). On suppose

$$m \gg m_{\text{bain}} \quad (18)$$

Force visqueuse $6\pi a\eta v$ ($d=3$). On postule en 1d:

$$m \frac{d^2x}{dt^2} = -6\pi\eta a v + X(t) \quad (19)$$

où X est une force **dont on ne sait rien sinon qu'elle est aléatoire.**

Remarque

Cette équation sépare deux canaux pour les flux d'énergie :

- 1 La force aléatoire donne de l'énergie.
- 2 La particule rend de l'énergie au bain par le canal de la dissipation.

Il existe deux canaux différents pour les flux d'énergie qui s'organisent pour que l'énergie de la particule soit finie. La dissipation est ici d'origine hydrodynamique. Les changements de conformation des molécules biologiques introduisent une nouvelle source de dissipation.

Du point de vue du temps propre de la particule lourde, les fluctuations de $X(t)$ ne sont pas corrélées :

$$\langle X(t)X(t-\tau) \rangle = G \times \delta(\tau) \quad (20)$$

soit

$$6\pi\eta a/m \times \tau_c \ll 1 \quad (21)$$

où τ_c est le temps de corrélation de la force.

On va montrer que l'équation de Langevin donne l'équation de diffusion.

On pose $\mu = 6\pi\eta a$

$$\begin{aligned} mx \frac{dv}{dt} + \frac{1}{2} m \frac{d^2x}{dt^2} - mv^2 \\ = \mu xv + xX = -\mu \frac{1}{2} \frac{dx^2}{dt} + xX \end{aligned} \quad (22)$$

Moyenne sur un grand nombre de particules $\rightarrow \langle \dots \rangle$. On a évidemment (?? - hum)

$$\langle xX \rangle = 0 \quad (23)$$

D'où

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} m \frac{d^2 \langle x^2 \rangle}{dt^2} - m \langle v^2 \rangle &= -\mu \frac{1}{2} \frac{d \langle x^2 \rangle}{dt} \\ \frac{1}{2} m \frac{d^2 \langle x^2 \rangle}{dt^2} - k_B T &= -\mu \frac{1}{2} \frac{d \langle x^2 \rangle}{dt} \end{aligned} \quad (24)$$

qui n'est qu'une équation différentielle du premier ordre.

D'où

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} \frac{d \langle x^2 \rangle}{dt} &= \frac{k_B T}{\mu} + C \exp \left[-\frac{\mu}{m} t \right] \\ &= \frac{k_B T}{\mu} \text{ en régime permanent} \end{aligned} \quad (25)$$

car

$$\frac{m}{\mu} = 10^{-8} \text{s} \quad (26)$$

En particulier, pour la distance caractéristique inspectée au bout d'un temps t

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{3\pi\eta a} t = Dt \quad (27)$$

où D est le coefficient de diffusion

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta a} \quad (28)$$

Illustration numérique

Il est facile d'intégrer numériquement l'équation de Langevin. On se place dans le régime des petits nombres de Reynolds. L'inertie ne jouant aucun rôle, l'algorithme permet de déterminer $x(t + dt)$ une fois $x(t)$ connu.

$$x(t + \delta t) = x(t) + \beta D \delta t \left[-\frac{dU}{dx} + F(x,t) \right] + (2D\delta t)^{1/2} X(t) \quad (29)$$

où $U(x,t)$ est un potentiel, $F(x,t)$ une force extérieure (Schéma d'Euler). On note que le préfacteur devant la force est \sqrt{D} : on retrouve ainsi l'équation de diffusion.

Schéma d'un algorithme d'Euler (le seul possible) pour une équation stochastique

```
double ITERATE(double x, double t, gsl_rng *r)
double resu;
resu = x + BETA*Delta_t*(-DUDX(x)+F(x,t)) + C*ALEA(r);
return resu;
```

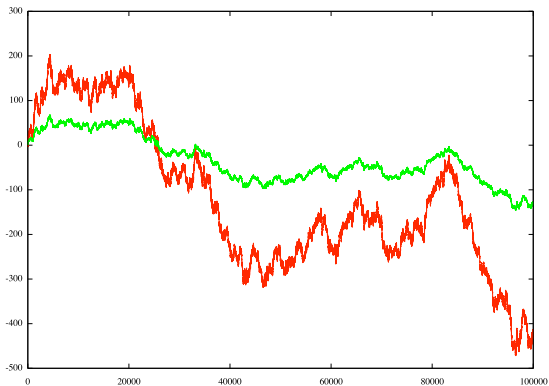


FIG.: Simulation numérique d'une particule brownienne dans un bain à 300K (eau). Le temps est mesuré en ps et les distances en Nm. La courbe rouge est obtenue pour une particule de 10 nm et celle en verte correspond à une particule de 100nm.

Hypothèses sous-jacentes

- Une force aléatoire $X(t)$ **forte** avec une mémoire courte;
- Une force **faible** $-\zeta v$ avec une mémoire longue;
- Ne s'applique pas aux particules du bain;
- Néglige les corrélations dans le fluide (on sait maintenant que c'est faux)

Conséquence

Temps de perte de mémoire de la vitesse $\tau_v = m / (\zeta) =$ temps au bout duquel la vitesse va changer de signe. Ce temps correspond à une distance $\tau_v \langle v^2 \rangle^{1/2}$. Mais

$$\frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

donc

$$\lambda = \frac{(mk_B T)^{1/2}}{\zeta}$$

libre parcours moyen entre deux chocs.

Application du mouvement brownien : diffusion sur une membrane

Résumé : 2 formules importantes

- 1 Pour une particule sphérique de rayon dans un fluide visqueux, le coefficient de diffusion de translation est donné par (relation d'Einstein) :

$$D_{\text{translation}} = k_B T / (6\pi\eta a) \quad (30)$$

- 2 Pour des particules diffusant dans un potentiel $U(x)$ avec concentration $c(x)$

$$\frac{c(x)}{c(0)} = \frac{e^{-U(x)/k_B T}}{e^{-U(0)/k_B T}} \quad (31)$$

où T est une notation pour

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (32)$$

Remarques sur le coefficient de diffusion

- 1 La formule $k_B T / (6\pi\eta a)$ n'est valable que pour une diffusion brownien dans une solution en trois dimensions où :

$$\langle R^2 \rangle = 4D_{\text{translation}} t \quad (33)$$

- 2 Il existe aussi un mouvement brownien de rotation

$$\langle \theta^2 \rangle = 2D_{\text{rotation}} t \quad (34)$$

For a protein in the membrane, matters are not that simple ! The particle moves through a two-dimensional liquid that is coupled to a surrounding three-dimensional solvent because of hydrodynamic interactions (no slip boundary condition). If h the thickness of the bilayer, there is a characteristic length scale:

$$L_{sd} = \frac{h\eta_m}{2\eta_f} \quad (35)$$

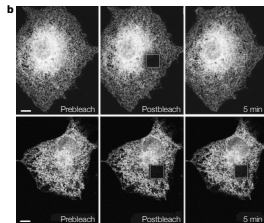
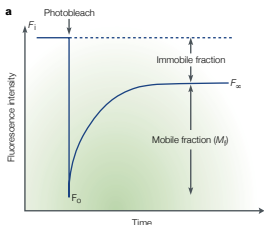
and :

$$D_{sd} = \frac{k_B T}{4\pi\eta_m h} [\ln(2L_{sd}/a) - \gamma] \quad (36)$$

where $\gamma = 0.577\dots$ (Saffman-Delbrück, 1975). Good for particles in reconstituted membrane (vesicles). Apply to proteins in cellular membrane?

Studying protein dynamics in living cells: FRAP experiments

- 1 Use protein tagged with fluorescent probes (GFP, DsRed).
- 2 Fluorescent molecules in a small region of the cell are irreversibly photo bleached using a laser. Subsequent movement into the photobleached area is recorded.
- 3 Concentrate on two kinetic parameters
 - 1 The rate of recovery : $\rightarrow D$
 - 2 The mobile fraction M_f (decrease in M_f indicates that the protein could be binding to another proteins. Increase in M_f means that the molecule is released from a compartment).



Top panel et bottom one correspond to the two cases (full and no recovery).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (37)$$

with initial conditions:

$$c(x,0) = \begin{cases} c_0 & \text{for } -L < x < -a \\ 0 & \text{for } -a < x < +a \\ c_0 & \text{for } +a < x < L \end{cases} \quad (38)$$

use no flux boundary conditions $\partial c / \partial x = 0$ at $x = \pm L$ which says that no material flows in or out.

The diffusion equation is solved in Fourier space:

$$c(x,t) = A_0(t) + \sum_0^{\infty} A_n(t) \cos\left(\frac{x}{L} n\pi\right) \quad (39)$$

where $\partial c / \partial x = 0$ for $x = \pm L$.

$$\frac{\partial A_0}{\partial t} = 0 \quad (40)$$

$$\frac{\partial A_n}{\partial t} = -\frac{Dn^2}{\pi^2} L^2 A_n(t) \quad (41)$$

Thus

$$c(x,t) = c_0 \left[1 - \frac{a}{L} - \sum_{n \geq 1} \frac{2 \sin(n\pi a/L)}{n\pi} e^{-(Dn^2 \pi^2 / L^2)t} \cos \frac{x}{L} n\pi \right] \quad (42)$$

Compute the Frap recovery curve by integrating the concentration in the photobleached region

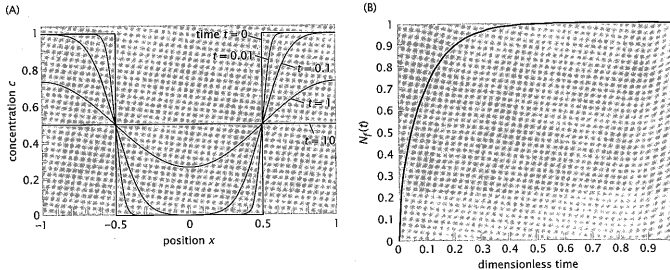
$$N_f(t) = \int_{-a}^{+a} c(x,t) dx \quad (43)$$

It gives

$$N_f(t) = 2c_0 a \left(1 - \frac{a}{L}\right) \left[1 - \frac{1}{a/L(1-a/L)} \sum_{n \geq 1} \frac{2}{n^2 \pi^2 \sin^2(n\pi a/L)} e^{-(Dn^2 \pi^2 / L^2)t} \right] \quad (44)$$

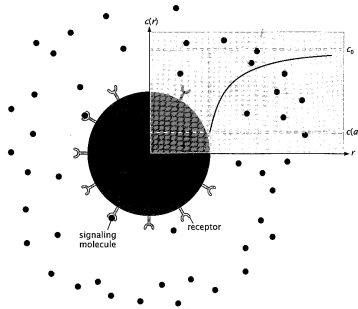
which can be used to fit experiments (full recovery).

One-dimensional model for Frap. Note that the total concentration $\int_{-L}^{+L} c(x,t)dx$ is constant so that $\lim_{x \rightarrow \pm L} c(x,t)$ decrease with time.



Modeling a cell signaling problem

What is the the number of signaling molecules that bind to the receptors per unit time (dn/dt)?



A depletion zone in the immediate vicinity of the surface is characteristic of the problem when ligands must diffuse from the bulk to be captured by the receptors.

Solving the diffusion equation with non trivial boundary conditions

Rate of uptake is proportional to the concentration $c(a)$

$$\frac{dn}{dt} = Mk_{on}c(a) \quad (45)$$

where M is the total number of receptor on the surface. We neglect unbinding. We must solve the diffusion equation in the bulk (in steady state)

$$\nabla c = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = 0 \quad (46)$$

It follows (note that the concentration increases at we move outwards):

$$c(r) = -A/r + B, A, B \text{ constant to be determined by the boundary conditions} \quad (47)$$

The rate of uptake is given by the current which flow inwards. The concentration of ligand at the surface follows

$$c(a) = \frac{c_0}{1 + (Mk_{on}/4\pi Da)} \quad (48)$$

and

$$\frac{dn}{dt} = \frac{Mk_{on}c_0}{1 + (Mk_{on}/4\pi Da)} \quad (49)$$

Two cases

- 1 The first is the limit case where $k_{on} \rightarrow \infty$. All particles arriving at the surface are absorbed. The reaction is said to be diffusion limited and not rate limited. Get a very useful relationship

$$\frac{dn}{dt} = 4\pi Dac_0 \quad (50)$$

- 2 In the general case, we may ask: how many receptors (M) do we need to get an adsorption rate which is half that of the diffusive limit?

$$\frac{Mk_{on}c_0}{1 + (Mk_{on}/4\pi Da)} = \frac{1}{2}4\pi Dac_0 \quad (51)$$

gives

$$M = \frac{4\pi Da}{k_{on}} \quad (52)$$

Take $a = 10\mu m$, $k_{on} = 10\mu M^{-1}.s^{-1}$ ($1\mu M = 600/\mu m^3$) So that

$$M \approx 10^5 \text{ receptors} \quad (53)$$

Conclusion: a sparse distribution of receptors can rival a perfectly adsorbing sphere.

Temps de premier passage

Application : Ordres de grandeur

Pour l'eau :

$$\eta = 10^2 \text{ g.cm}^{-1} . \text{s}^{-1} \quad (54)$$

Si $a = 10^{-6} \text{ cm}$

$$D = k_B T / (6\pi\eta a) = 2.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 . \text{s}^{-1} \quad (55)$$

Le temps

$$t_{diff} = \langle R^2 \rangle / D \quad (56)$$

est le temps au bout duquel on peut trouver la particule n'importe où dans une région de taille R . En particulier, c' est le temps au bout duquel un marcheur aléatoire atteint la surface de la sphère de rayon $[\langle R^2 \rangle]^{1/2}$ et sort de cette sphère. Ce temps ne dépend donc **pas** du fait que la particule soit **confinée** ou non.

Autre temps caractéristique : temps au bout duquel une particule brownienne trouve une cible de rayon $a_0 = t_{traffic}$ à l'intérieur du volume cellulaire V (le mouvement est ici **confiné**)

En règle générale :

$$t_{traffic} \gg t_{diff} \quad (57)$$

$t_{traffic}$ est ce que l'on appelle en physique statistique le **temps de premier passage**. Les deux temps sont manifestement différents : l'un ne dépend pas du fait que le

Résultat

Si V est le volume et r la distance

Supposant mouvement brownien (Cf. S. Condamin et al.)

$$\begin{aligned}
 t_{\text{traffic}} &\sim V \left(A - Br^{2-d} \right) \text{ si } d > 2 \\
 t_{\text{traffic}} &\sim V (A + B \ln r) \text{ si } d = 2 \\
 t_{\text{traffic}} &\sim V \left(A + Br^{2-d} \right) \text{ si } d < 2
 \end{aligned} \tag{58}$$

où A et B sont deux constantes indépendantes du volume de confinement. On a donc dans tous les cas le résultat surprenant (on n'atteint pas la cible en milieu non confiné)

$$\lim_{V \rightarrow \infty} t_{\text{traffic}} = \infty \tag{59}$$

D'où

Si $V = L^3$ où L taille caractéristique (noter que le résultat est indépendant de la taille a si $a = a_0$)

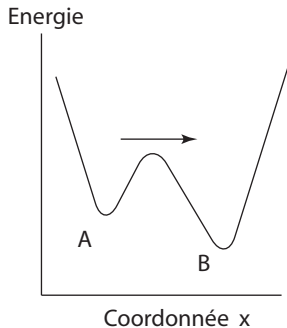
$$t_{\text{traffic}} / t_{\text{diffusion}} \simeq L/a \Rightarrow t_{\text{traffic}} = \frac{\eta V}{k_B T} \approx 1s \tag{60}$$

Si $V = L$ (dimension 1)

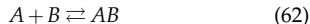
$$t_{\text{traffic}} = t_{\text{diffusion}} \tag{61}$$

Force spectroscopy on single molecules

We want to characterize the behavior of a molecule under stretching or under torsional mechanical force. The prototypical question is to understand how a non-covalent bond breaks under the action of an external force. Like all chemical reactions, bond rupture on the scale of a single bond is not a deterministic event. It is a stochastic event.



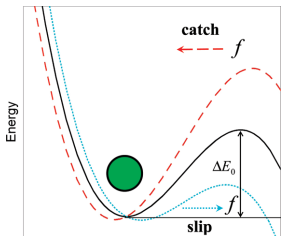
The usual way to look at chemical reactions is to consider averages over an ensemble of molecules (10^{23}). For single molecule experiments, there is no self-averaging. The process is per se **stochastic**. Let us consider the simple reaction scheme



We introduce a reaction coordinate x (distance between A and B).

- 1 x small A bound to B
- 2 x large A dissociated from B

An external force shift the energy barrier



To break the bond, the system must diffuse by Brownian motion over an energy barrier. The height of the energy barrier sets the relevant time scale for the dissociation constant.

$$k_{off} \propto e^{-\Delta E(f)/k_B T} \quad (63)$$

In short, the dissociation of the complex can be seen as the translocation of a brownian particle. When an external force f is applied to the bond, this amounts to saying that the particle diffuse under the action of a force f .

In general, an external force changes the energy landscape and shift the energy the barrier :

$$\Delta E(f) = \Delta E(0) \pm \Delta x \quad (64)$$

where Δx is the width of the barrier at zero force.

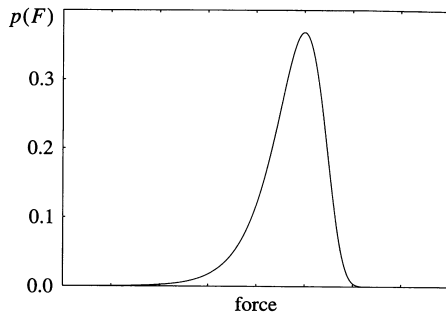


FIG.: Probability distribution for the rupture. There is a maximum.

The rupture force depends on the loading rate. The faster one applies the force, the largest is the rupture force (slip bonds)

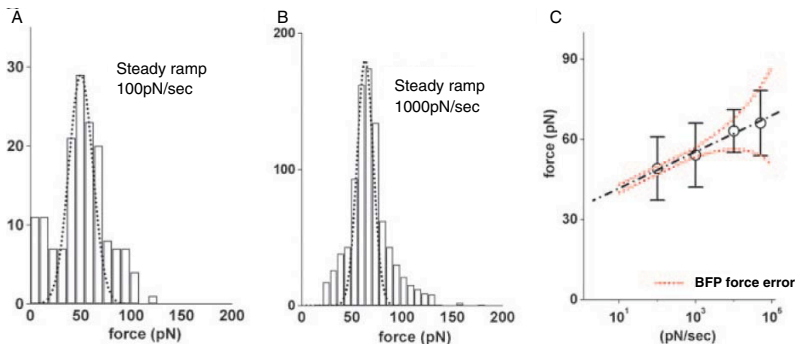
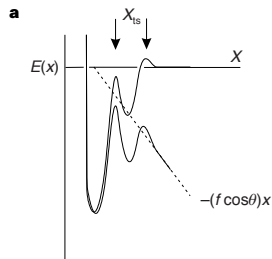
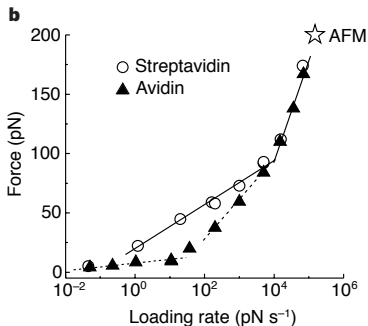
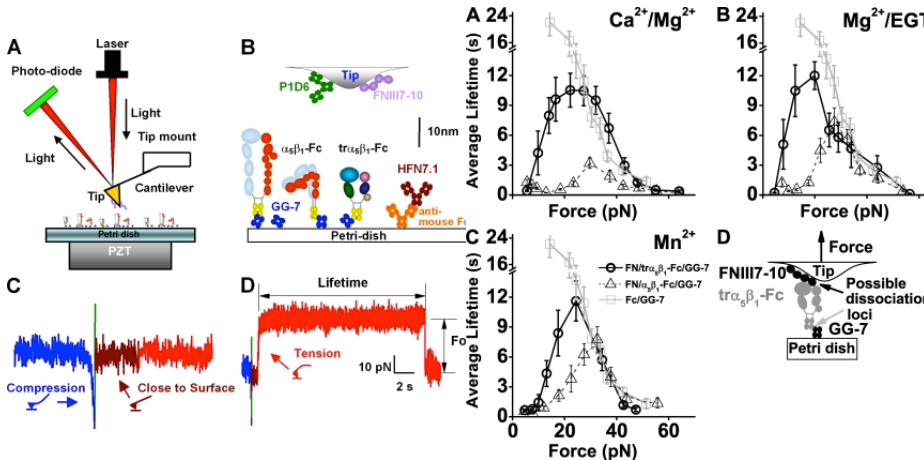


FIG.:

Measurement of rupture force as a function of loading rate allows to characterize the pathway during dissociation



The effect of the force can be subtle. Catch bonds are bonds with a life time which increases with the force. Here, the demonstration of a catch bond between an integrin and its ligand.



Application aux mesures extension-force des molécules d'ADN isolées

Le mouvement brownien trouve ici une application sur la mesure de forces très faibles pour des molécules biologiques isolées. Il s'agit d'une méthode très précise, puisque le domaine des forces mesurées va de la dizaine du femto-newton à la centaine de pico-newton.

Le version étudiée ici correspond à la méthode de Croquette et Bensimon (ENS, Paris, Picotwist). Elle utilise des pinces **magnétiques**, ce qui permet de s'affranchir de dégagements de chaleur et, surtout, d'appliquer un couple de torsion sur une molécule.

Schéma du dispositif expérimental

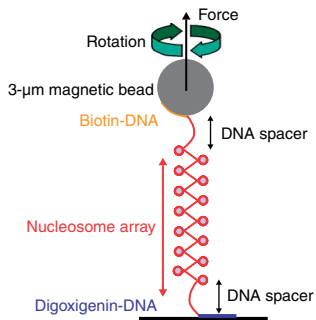
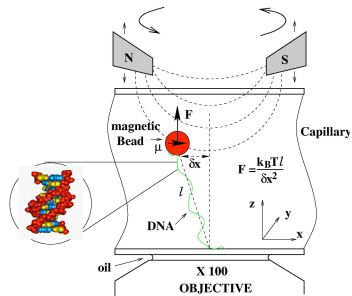
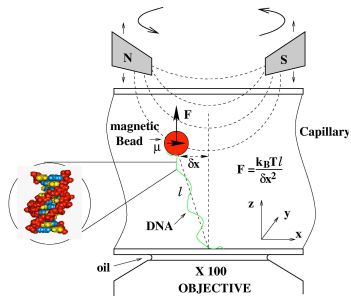


Figure 1 Schematic of the experiment. A single nucleosome array (~ 7.5 kbp), sandwiched between two naked DNA spacers (~ 600 bp each), is linked to a coated surface and to a magnetic bead. A pair of magnets placed above this molecule exerts controlled torsional and extensional constraints⁸.



- Un ADN est greffé de manière covalente au substrat et à une bille magnétique de taille caractéristique $1\mu m$. Les fluctuations de position de la bille sont observables.
- Un gradient de champ permet d'appliquer une force $F\hat{u}_z$ sur la bille. Le problème est d' **étalonner** la force F .
- Grâce à un champ alternatif, on peut faire tourner la bille. Nous ignorons cette possibilité (pour l'instant).



- Le pendule possède une raideur dans la direction transverse k_{\perp} avec

$$k_{\perp} = \frac{F}{l}$$

où l est **mesurable**.

- La théorie va nous donner F à partir des mesures de fluctuation de la position transverse.

$$F = k_B T l / \langle x^2 \rangle$$

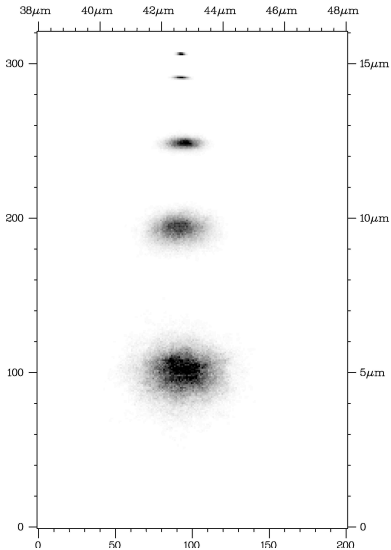


FIG.: Enregistrement de la position instantanée de la bille dans le plan perpendiculaire à l'axe de l'objectif. Plus la molécule est étirée, plus l'amplitude du mouvement brownien perpendiculaire à l'axe est restreint et plus la tache est centrée. Cet enregistrement permet à l'aide du théorème FD de déterminer les constantes élastiques de rappel et, ainsi, de déterminer la force à laquelle la molécule est soumise.

Théorie

Lorsqu'elle s'écarte de la position d'équilibre, nous supposons que la molécule développe une force RADIALE F_r dans la direction \hat{u}_r mais de sens opposé avec (z mesure les fluctuations par rapport à l):

$$r = \left(x^2 + y^2 + (z+l)^2\right)^{1/2} \quad (65)$$

Par définition, les composantes F_x, F_y, F_z de la force de rappel sont données par

$$\begin{aligned} F_x &= -\frac{x}{r} F_r \\ F_y &= -\frac{y}{r} F_r \\ F_z &= -\frac{z+l}{r} F_r \end{aligned} \quad (66)$$

Pour des déplacements petits, on a au premier ordre

$$r = \left(x^2 + y^2 + (z+l)^2\right)^{1/2} = l + z + O(x^2 + y^2 + z^2) \quad (67)$$

et comme la force est radiale, elle ne dépend que de r . On peut donc faire son développement limité

$$F_r(r) \approx F_r(l) + z \frac{dF_r}{dr} \Big|_{r=l} \quad (68)$$

Nous pouvons donc connaître la force de rappel exercée par la molécule lorsque la bille s'écarte de sa position d'équilibre

$$\mathbf{F}_{\text{Rappel}} = -\frac{x}{l} F_r(l) \hat{u}_x - \frac{y}{l} F_r(l) \hat{u}_y - z \frac{dF_r}{dr} \Big|_{r=l} \hat{u}_z \quad (69)$$

où les termes d'ordre 0 sont compensés par la force appliquée par le dispositif de mesure.

L'énergie élastique associée à cette force de rappel est donc quadratique dans les déplacements. Elle prend une forme très simple

$$U(x,y,z) = \frac{1}{2}k_{\perp} (x^2 + y^2) + \frac{1}{2}k_{\parallel}z^2 \quad (70)$$

où les constantes de rappel ne dépendent que de la force et de ses dérivées :

$$\begin{aligned} k_{\perp} &= \frac{F_r(l)}{l} \text{ Parallèle au substrat} \\ k_{\parallel} &= \frac{dF_r(l)}{dr} \text{ Perpendiculaire au substrat} \end{aligned} \quad (71)$$

La mesure expérimentale du spectre des fluctuations permet de déterminer les valeurs moyennes $\langle x^2 \rangle$, $\langle y^2 \rangle$ et $\langle z^2 \rangle$. En utilisant le théorème d'équipartition

$$\frac{1}{2}k_{\perp} \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_{\perp} \langle y^2 \rangle = \frac{1}{2}k_{\parallel} \langle z^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T \quad (72)$$

On peut en déduire k_{\perp} et k_{\parallel} et donc la force $F_r(l)$ et sa dérivée. La figure?? donne une représentation de l'historgramme des fluctuations de la position instantannée de la bille à des instants successifs. On peut donc reconstruire la distribution de probabilité des fluctuations et déterminer les constantes élastiques.

Modèle du ver

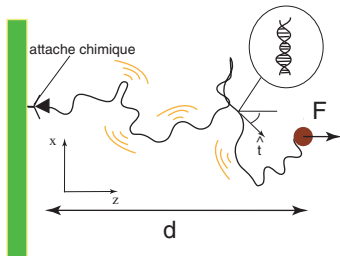
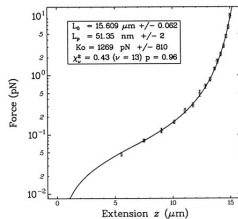


FIG.: Caractéristique extension-force par micromanipulation mécanique de l'ADN. La divergence apparente au voisinage de l'extension maximale est ajustée au résultat théorique.



Signaling in space and time

23 juin 2014

Biochemical networks more than signaling pathways, since a lot of interconnections

Biochemical networks are organized as

- 1 Metabolic networks
- 2 Signalisation - transduction
- 3 Genetic regulation

Cell mechanics → Signalisation-Transduction : Striking facts

- 1 Difficult (useful?) to write down all chemical reactions. Key point : a signal which interacts with one molecule can develop a complex excitation pattern (emergent properties or collective behaviors).
- 2 A Network has more than one functioning point. Multi-stability is a general rule (Cf. Mathematics : Bifurcations)
- 3 Biochemistry and mechanics are connected
- 4 Proteins are seen as binary switches : They exist in at least two functional states, one being assumed to be the inactive state. They are blocked in that state by an intramolecular interaction. An input signal releases this auto inhibition, resulting in an output signal generated by the active conformation.
- 5 Noise suppression by a sigmoidal characteristic of signal transmission.

In general

Proteins = series amino acid sequences.

- 1 Functional modules : ex. Catalytic domain of an enzyme.
- 2 Interaction : non-covalent, many possible partners, identical to regulatory modules (terminal for input signal)

Interaction domain

- 1 The recognition site is a short amino acid sequence (SH3 + Pro-x-x-Pro, SH3 + ARG-x-x-Lys)
- 2 The recognition site is short amino acid sequence containing a covalent modification (phosphorylation, ubiquitination etc.) : SH2, PTB + Phospho-Tyr
- 3 The recognition site is a membrane component : phosphoinositides ...
- 4 others : homotypical interactions

Docking domains

The vast majority of proteins kinase can interact with large number of proteins. Specificity? need additional binding sites distinct from the interacting site with the catalytic center

Adaptor and scaffold proteins

Need for assembly of multi protein complex. The probability of encounter of 3 proteins is much more small than for 2! Adaptor proteins have interaction domain but lack functional domain. They are molecular multi-plugs.

Sensing the environment

Cells show an astounding awareness of the environments in which they find themselves, actually adapting their behavior to changing surrounding. The key to this ability is the constant sampling of their environment both at the molecular and mechanical level. These are signals that convey information to the cell.

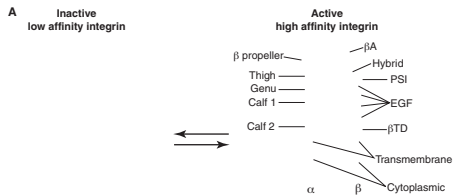
One distinguishes :

- 1 outside-inside signals (cell to cell, substrate to cell) : hormones, CAMP signaling, adhesive molecules ...
- 2 inside-outside signals with many molecular switches : interaction domain of proteins, second messengers, G-proteins, intra-cellular signaling for receptor activation ...

Receptors

- 1 Trimeric G-Proteins-coupled receptors (7 helices embedded in membranes, large family in animal cells)
- 2 Signal transduction by tyrosine kinase and protein phosphatase- coupled receptors.

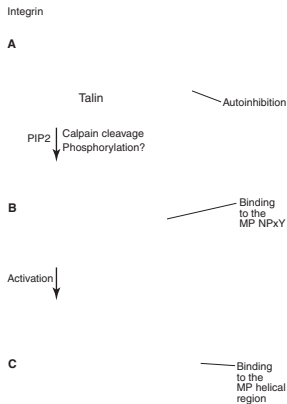
Les intégrines : signalisation inside-outside et signalisation outside-inside



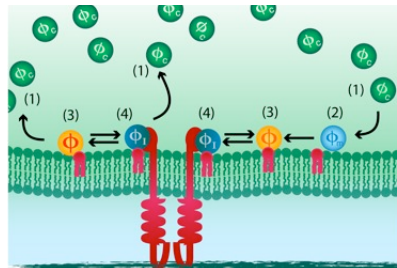
Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion trans-membranaires

- 1 possédant un domaine extra-membranaire long
- 2 et un domaine cytosolique court. Ce domaine sert de point d'ancrage aux protéines qui vont lier l'intégrine aux différents réseaux de signalisation.
- 3 une intégrine est un système à deux états. Un état **inactif** où le domaine extracellulaire est replié et un état **actif** où il est déplié. La protéine est alors capable de se lier à son ligand.

Les intégrines doivent être activées par des partenaires[?]: inside-outside signaling



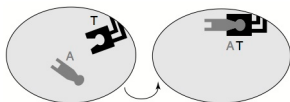
Cycle d'activation des intégrines par la taline (non active dans le cytosol, ϕ_c , devient active une fois adsorbée sur la membrane ($\phi_m \rightarrow \phi$), forme un complexe avec les interines (ϕ_I) et retourne dans le cytosol.



D'après O. Ali.

Why cytoplasmic signaling proteins should be recruited to cell membranes?

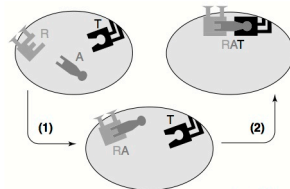
Piggyback mechanism : To increase the number of signaling complexes



trends in Cell Biology

FIGURE 2

Direct interaction between a cytosolic protein A and a membrane-anchored target protein T, leading to the formation of the complex AT.



trends in Cell Biology

FIGURE 3

Piggyback mechanism of the complex formation between a cytosolic protein A and a membrane-anchored target protein T. Interaction of A and T is promoted by first binding A to the receptor R after activation of R, which recruits A to the membrane surface.

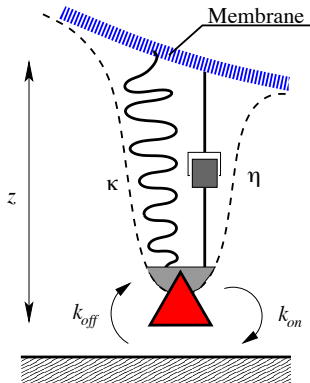
Concentrating proteins in a small volume just below the plasma membrane increases the number (or averaged life time) of cognate signal transduction proteins (Kholodenko, 2000) : $V_c/V_m \approx 1000$.

Integrin activation and mechanical forces: Bell's law

Biological adhesion systems use discrete molecular bonds with mechanical properties. This mechanical properties affect the resistance to rupture and this a key-importance to understand cell adhesion. Bell[?] has proposed a model that uses an exponential relationship for the dissociation constant

$$k_{off} = k_{off}^0 e^{f_b \Delta / k_B T} \quad (1)$$

where f_b is the force on the bond and Δ is the distance range of the bond potential energy minimum (width of the interaction pocket). This law has been tested in experiments[?].



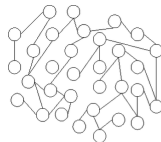
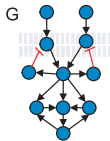
At equilibrium the number of bound receptor-ligand pairs, n_b , obeys Boltzmann's law

$$n_b = \frac{n_0}{1 + K_e^0 e^{f_b \Delta / k_B T}} \quad (2)$$

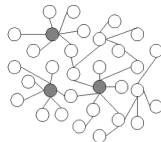
where n_0 is the total number of receptors on the membrane and $f_b = \kappa z$ for a bond deformation z and rigidity κ . $K_e^0 = k_{on}/k_{off}$ is the affinity constant at zero force. Thus, as the tearing force f_b increases the number of bound receptor-ligand pairs decreases.

Integrins are **hubs** for cellular signalisation : System biology

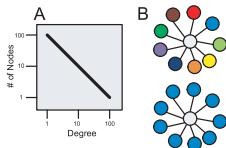
- 1 Network = Nodes (proteins or genes) + links (interaction between them)
- 2 The connectivity n gives the the number of links connected to a node.
- 3 The degree distribution, $P(n)$, describes the probability that a node has n links



(a) Random network



(b) Scale-free network



D'après [?].

Ce qui est important est la connectivité (degré du vertex) des noeuds du réseau. La probabilité a une loi de puissance ($\propto 1/n^\beta$) et certains noeuds sont liés à beaucoup de "voisins" (i.e. protéines interagissantes avec beaucoup d'autres protéines à des endroits différents et à des temps différents). Ces noeuds permettent de connecter différents réseaux.

An exemple of a ... useful picture

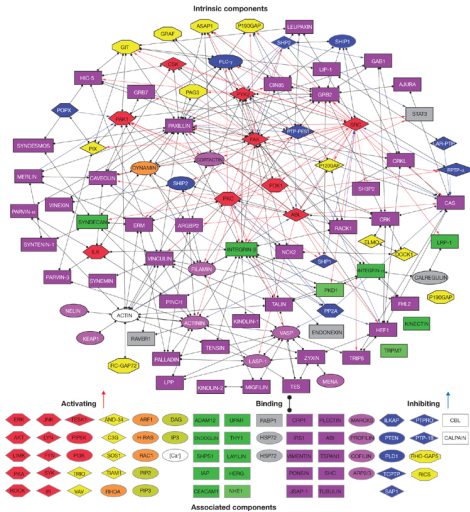
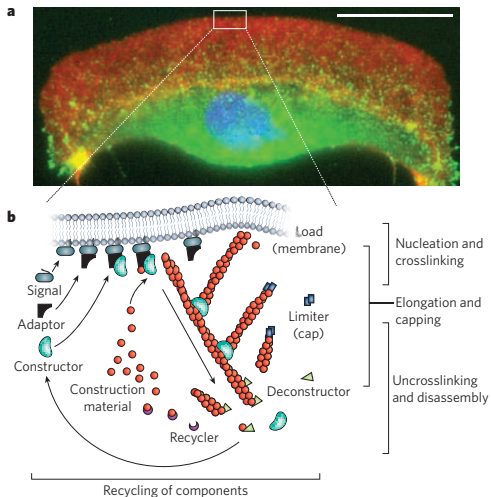


FIG.: D'après[?]

Note! Energy supply breaks the principle of detailed balance. Cycles are traversed in one direction !

An example : actin polymerization-depolymerization cycle for a motile cell



Note that the cycle is one way because ATP-ADP exchange.

G-proteins: small G-proteins Ras, Rho-Rac-Cdc42 (and trimeric G _{α,β,γ} !)

Cell signalization : From the outside to the inside

Un **ligand** (petite molécule) « s'accroche » sur une grosse molécule ancrée sur la membrane (le récepteur). Alors la conformation du récepteur dans la partie cytoplasmique change et cela permet une réaction avec des partenaires cytoplasmique. Une classe importante (cible thérapeutique) de ces récepteurs active des protéines qui vont employer le **GDP** pour leur activité. Ici, le GDP remplace l'ADP comme monnaie d'échange. C'est pour cela que l'on nomme les « protéines **G** ».

Upstream of Rho, Rac, Cdc42

Ras proteins are permanently anchored to the membrane. Rho, Rac, cdc42 shuttle between cytoplasm and membrane. They are activated by all kind of transmembrane receptors.

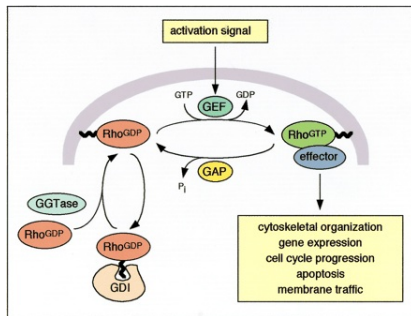
Dowstream of Rho, Rac, Cdc42

Control of cell shape and motility.
Coordination, gradient ?

Cycling between the on-off states : GEF and GAP proteins.

Transductrices d'information

- 1 Une protéine G est liée au GDP: elle est ⇒ **inactive**
- 2 Parce qu'il y a réception d'un signal (provenant d'un récepteur), la protéine G échange le GDP pour le GTP : elle devient **active** et elle peut alors interagir avec d'autres protéines.
- 3 Une protéine G n'est pas capable de se désactiver elle-même en transformant le GTP en GDP (minute GTPase activity)



Remarque

Il existe 2 classes de protéines G. Les « grosses » **directement liées** aux récepteurs (dissociation de l'unité $\alpha\beta\gamma$ en $\alpha + \beta\gamma$) et les petites (monomériques) qui ne sont pas directement activées par les récepteurs mais le sont par une enzyme qui les active à **distance**.

Ref :

<http://www.scq.ubc.ca/g-proteins-molecular-switches-for-sensing-the-environment/>

Introduction

One major contributing factor is that a cell behaves as a nonlinear dynamical system. As we discussed, proteins interact among themselves, both directly, through enzymatic action or through binding, as well as indirectly, through their control of gene expression. Each of these modes of interaction may involve feedback loops. Feedback is properly understood as a dynamic phenomenon, where quantities, such as concentrations of proteins, RNA, metabolites, and other cell substances are seen as functions of time.

Dynamical systems : What's the hell?

Given $x, y =$ concentrations of X and Y . Either ordinary differential equation (Well mixed regime, signaling in time)

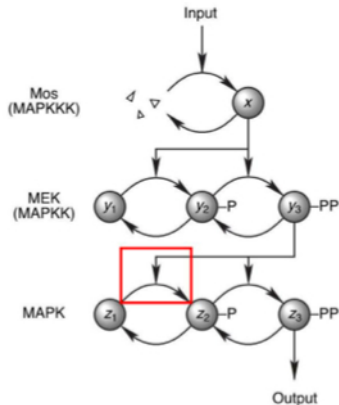
$$\frac{dx}{dt} = f(x,y) \quad (3)$$

Or partial differential equation (signalling in space and time)

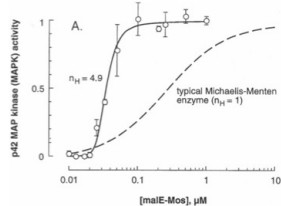
$$\frac{\partial x}{\partial t} = D\Delta + f(x,y) \quad (4)$$

Where $D =$ diffusion constant.

An example: The MAPK system



The basic rule is that two proteins, called generically MAPK and MAPKK (the last K is for “kinase of MAPK,” which is itself a kinase), are active when doubly phosphorylated, and MAPKK phosphorylates MAPK when active. Similarly, a kinase of MAPKK, MAPKKK, is active when phosphorylated. A phosphatase, which acts constitutively (that is, by default it is always active) reverses the phosphorylation.



The response is sigmoidal.

Robustness : different meanings in different contexts

Definition

"A feature or phenomenon is robust with respect to the set of perturbations that it is able to withstand" : has to be compatible with evolution (adaptability).

Examples

- 1 Sensing nutriment by bacteria
- 2 Robustness in protein folding
- 3 Hair-cell self-adaptation at a bifurcation point

Different strategies

- 1 Physical mechanisms : stability (dynamical systems, universality, or self-organisation).
- 2 Biological mechanisms : redundancy, repair or regulation.

A second (well studied) example. Chemotaxis : sensing nutriment by bacteria

Bacteria are sensitive to gradient but density fluctuations are too large to rely on differential sensing by comparing molecules arriving from front to rear. Strategy employed : Alternation of directed motion with "tumble" phase. What is regulated is the duration of the directed phase.

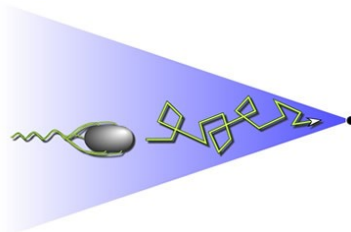
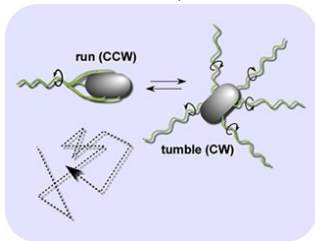
Life at low Reynolds number : le règne des nanotechnologies

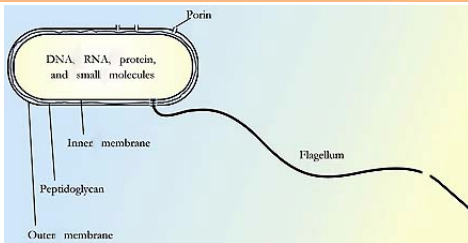
De Howard Berg (Physics Today, janvier 2000)

« *E. Coli*, a self-replicating object only a thousandth of a millimeter in size, can swim 35 diameters a second, taste simple chemical in its environment, and decide whether life is getting better or worse. »

- Vit dans nos estomacs (désolé ...sorry).
- 4286 gènes $\simeq 1 \mu m$ diamètre (*H. sapiens* $\simeq 25000$)
- Présence de flagelles (\Rightarrow Motiles sauf mutants sans flagelle)
- vitesse = 60 fois sa longueur en 1 seconde (\gg tous animaux macroscopiques !)

A random walk in isotropic environments A biased walk in a chemoeffector gradient

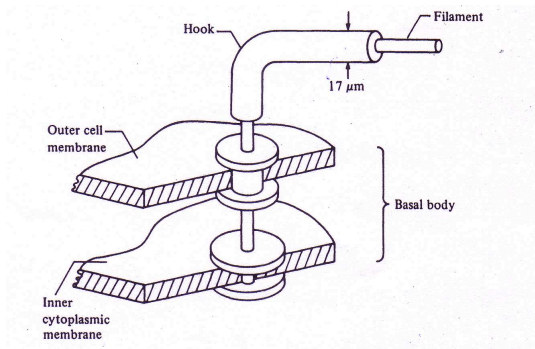




(a)



(b)



(c)

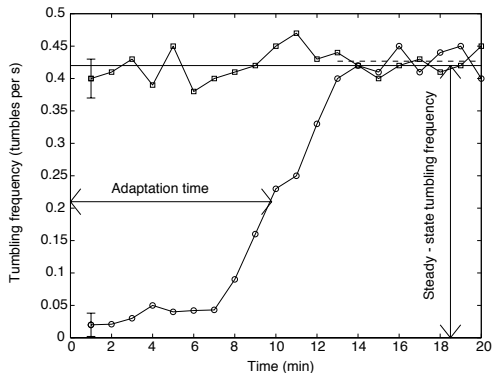
E. Coli

Lorsque la rotation des flagelles a lieu dans le sens horaire, les filaments forment une tresse et la rotation des flagelles entraîne un mouvement continu de la bactérie vers l'avant. Au contraire, lorsque les moteurs tournent dans le sens anti-horaire, les mouvements des flagelles ne sont plus coordonnés et la bactérie a un mouvement de culbute qui lui permet de changer de direction.

Le mouvement des moteurs est dû à un **flux** de protons de l'extérieur vers l'intérieur. Une rotation nécessite environ 1000 protons et celle-ci est assurée par un corps basal enfoui sous la membrane plasmique.

Tout comme les machines rotatives artificielles, le corps basal est constitué d'anneaux externes qui jouent le rôle de stator et qui permettent de stabiliser l'ensemble, alors que la rotation est assurée par des anneaux internes qui jouent le rôle de rotor. Une quarantaine de gènes sont requis pour l'assemblage de cette machine moléculaire.

Définition : au bout d'un certain temps pendant le quel on a appliqué des perturbations, le système est indifférent aux perturbations. Il s'est **adapté**



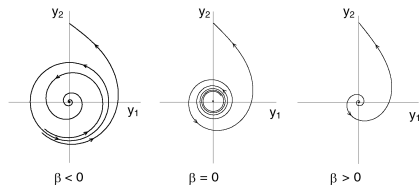
Hopf's Bifurcation

We want to understand how the systems changes behavior as a parameter is varied.
Hopf's bifurcation : Generic mechanism to go from a stationary state to an oscillating state.

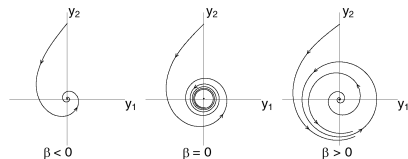
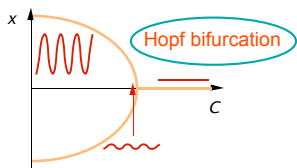
Let β be the parameter. We look for the solutions of

$$\frac{dy_{1,2}}{dt} = f(y_{1,2}(t), \beta) \quad (5)$$

Depending on β , solutions can oscillate. They are better seen in **phase space** (y_1, y_2).



Sub-critical bifurcation: Unstable fixed point \rightarrow limit cycle.



Super-critical bifurcation: A stable fixed point gives birth to a limit cycle.

Abstract

One may investigate the basis of the active process in either of two ways. Most studies have focused on the subcellular and molecular details of the candidate mechanisms, membrane-based electromotility and active hair-bundle motility. Despite the present uncertainties in the field, such detailed mechanistic investigations must ultimately reveal the origins of the four cardinal aspects of the active process: **amplification, frequency tuning, compressive nonlinearity, and spontaneous acoustic emission**. A second approach is to inquire, not about mechanistic details, but instead about the principles underlying the active process. What feature of the active process accounts for the unusual phenomena associated with hearing? What is the connection between the four manifestations of the active process observed in amphibians, reptiles including birds, and mammals? We contend that the answers to these questions are the same: critical oscillation at a Hopf bifurcation ...

From P. Martin and A.J. Hudspeth[?]

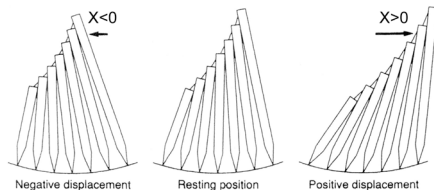
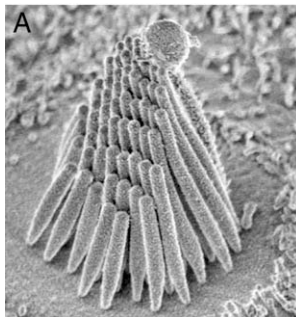


FIG.: Le mouvement entraîne des bouffées de potassium qui a leur tour régulent le fonctionnement des myosines 1 (Ca^{2+}). D'après P. Martin, 2008.

FIG.: Hair cell. See P. Martin, 2008.

Ajustement des oscillateurs : mécanisme de la résonance (super-critique) de Hopf

- (a) Active amplifiers : Ear contains a set of nonlinear dynamical systems each of which can generate self-sustained oscillations at a different characteristic frequency.
- (b) Self-ajustement : Feedback control mechanism maintains each system on the verge of oscillating

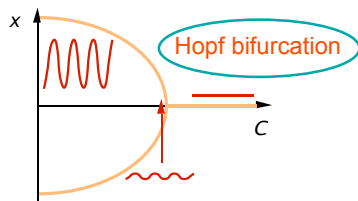


FIG.: Oscillateur entretenu par une force. Oscille spontanément à un point critique. En changeant la valeur du paramètre où le système change de comportement on passe par une bifurcation de Hopf (c'est une éventualité du point de vue théorique, car il existe plusieurs type de bifurcations pour $n \geq 2$). C'est une « vérité » du point de vue expérimental (démontré dans les expériences).

Réponse non-linéaire au voisinage de la bifurcation

Les non-linéarités sont essentielles (sinon oscillateur classique sans changement d'état)

$$\dot{z} = (\beta + i\omega_0)z - \|z\|^2 z + Fe^{i\omega t} \quad (6)$$

Deux fréquences :

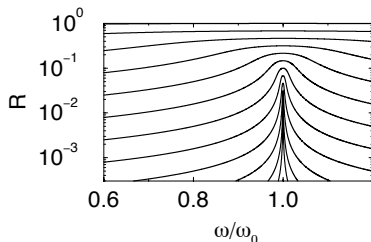
- ① ω_0 : pulsation propre de l'oscillateur
- ② ω : pulsation de la force extérieure qui perturbe l'oscillateur

On suppose :

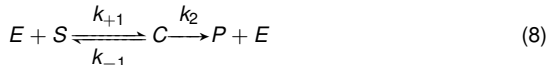
$$z = Re^{i\omega t + \phi} \quad (7)$$

deux cas très différents

- ① $\omega \neq \omega_0$ alors $R = F/|\omega - \omega_0|$ (réponse linéaire)
- ② $\omega = \omega_0$ alors $R = F^{1/3}$ (réponse non-linéaire : $dR/dF = \infty, F \rightarrow 0$)
→ The gain diverges for weak stimuli.



Nous considérons la réaction suivante (Leonor Michaelis et Maud Menten, 1913). L'enzyme E, présent en faible quantité, réagit avec le substrat S pour donner C qui se décompose à son tour en un produit P avec l'enzyme E. Le schéma est le suivant :



L'intérêt de ce système est qu'il donne une cinétique d'ordre 0 aux temps courts et que la réaction peut se produire même pour un très faible concentration de l'enzyme E. L'irréversibilité de la dernière équation est cruciale.

Les propriétés sont les suivantes :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max} S}{K_m + S} \approx V_{max} / K_m \text{ avec } K_m = 1 + \frac{k_2}{k_1} \quad (9)$$

où la dernière égalité est obtenue dans la limite de la saturation

avec des notations évidentes pour les taux de réaction, nous avons 4 équations chimiques couplées :

$$\begin{aligned}\frac{dr}{dt} &= -k_{+1}se + k_{-1}c \\ \frac{dc}{dt} &= k_{+1}se - k_{-1}c - k_2c \\ \frac{de}{dt} &= k_2c - k_{+1}se + k_{-1}c \\ \frac{dp}{dt} &= k_2c\end{aligned}\tag{10}$$

ce qui permet de tirer $p(t)$ par

$$p(t) = k_2 \int_0^t c(u) du\tag{11}$$

et il nous reste trois équations où on peut éliminer e grâce à (additionner les lignes 2 et 3 de l'équation précédente)

$$\frac{de}{dt} + \frac{dc}{dt} = 0 \quad (12)$$

d'où $e(t) + c(t) = e_0 = \text{Cte}$. Il nous reste

$$\begin{aligned} \frac{ds}{dt} &= -k_{+1}e_0s + (k_{+1}r + k_{-1})c \\ \frac{dc}{dt} &= k_{+1}e_0s - (k_{+1}r + k_{-1} + k_2)c \end{aligned} \quad (13)$$

Cette approximation qui n'a pas de justification revient à supposer que $dc/dt = 0$ dans (??). On crée autant d'espèce C que l'on en détruit (Cf. Eq. (??)). On a alors

$$c(t) = \frac{e_0 s(t)}{s(t) + K_m} \text{ avec } K_m = 1 + \frac{k_2}{k_1} \quad (14)$$

ce qui justifie à posteriori $dc/dt = 0$ si la concentration d'enzyme à l'instant initial e_0 tend vers 0 (mais pour $e_0 \rightarrow 0$, il ne peut pas voir de réaction par définition!). On en tire

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V_{max} s(t)}{s(t) + K_m} \text{ avec } V_{max} = e_0 k_2 \quad (15)$$

qui est la vitesse maximale de la réaction lorsque le réactant S a une concentration saturée, la vitesse étant alors indépendante de la concentration de substrat. Nous avons aussi

$$\frac{dr}{dt} = -\frac{V_{max} s}{K_m + s} \quad (16)$$

Le résultat (??) marche dans la pratique et sera démontré par la suite.

Pour poursuivre, renormalisons les variables et introduisons

$$\begin{aligned}x &= \frac{S}{S_0} \\ y &= \frac{C}{e_0}\end{aligned}\tag{17}$$

Posons

$$\epsilon = \frac{e_0}{S_0}\tag{18}$$

qui est petit si la concentration d'enzyme est faible. Ce rapport fixe le **petit paramètre**

En coordonnées réduites, le système se ramène à :

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \epsilon [k_{-1}y - s_0k_{+1}x(1 - y)] \\ \frac{dy}{dt} &= k_1 [s_0x - (K_m + s_0x) y]\end{aligned}\tag{19}$$

avec $K_m = k_{-1}/k_{+1} + k_2/k_1$.

Par hypothèse, ϵ est petit car la concentration d'enzyme à $t = 0$ (e_0) est petite devant la concentration initiale de réactant (s_0). Nous faisons l'approximation $\epsilon = 0$ et, donc, $dx/dt = 0$. La variable $y(t)$ varie donc beaucoup plus vite que la variable $x(t)$ qui est lente. Cette approximation n'est valable qu'aux temps courts et comme $dx/dt = 0$, $x(t)$ est constant, soit $x(t) = \bar{x}$ qui sera déterminé par après.

La deuxième équation est alors évidente. La variable $y(t)$ approche rapidement sa valeur asymptotique. Pour comparer avec les solutions numériques du système (??), nous réécrivons cette solution en fonction de la concentration $c(t)$ comme

$$c(t) = \frac{s_0}{s_0 + K_m} (1 - \exp[-(K_m + s_0) t]) \quad (20)$$

et on trouve bien une cinétique d'ordre 0 pour $p(t)$ car dp/dt est proportionnel à $c(t)$. L'interprétation physique de ϵ est alors la suivante : $k_{+1}\epsilon$ définit le temps caractéristique au-delà duquel les solutions diffèrent de leurs conditions initiales et à partir duquel un état quasi-stationnaire est établi. Durant ce premier pas de temps, $p(t)$ est linéaire.

Pour connaître le comportement des solutions aux temps longs, nous utilisons un temps renormalisé défini par

$$\tau = k_1 \frac{t}{\epsilon} \quad (21)$$

et nous supposons que les solutions peuvent être approchées par un développement asymptotique du type¹

$$\begin{aligned} x(\tau) &= \sum_{n \geq 0} \epsilon^n x^{(n)}(\tau) \\ y(\tau) &= \sum_{n \geq 0} \epsilon^n y^{(n)}(\tau) \end{aligned} \quad (22)$$

1. À l'ordre auquel nous travaillerons, il suffira de restreindre à renormaliser le temps par le facteur ϵ . En théorie, il est possible de trouver ce facteur de renormalisation en considérant un développement multi-échelle.

À l'ordre zéro en ϵ , on trouve

$$\begin{aligned}\frac{dx^{(0)}}{d\tau} &= \frac{k_{-1}}{k_1} y^{(0)} - s_0 x^{(0)} \\ 0 &= s_0 x^{(0)} - \left(K_m + s_0 x^{(0)} \right) y_0\end{aligned}\tag{23}$$

où la deuxième équation est une équation algébrique dont la solution est évidente :

$$y^{(0)} = \frac{s_0 x^{(0)}}{K_m + s_0 x^{(0)}}\tag{24}$$

avec $x^{(0)}$ est solution de

$$\frac{dx^{(0)}}{d\tau} = -s_0 x^{(0)} \left[\frac{k_2/k_1}{K_m + s_0 x^{(0)}} \right]\tag{25}$$

Il est maintenant utile de se ramener à des variables de concentration non renormalisées

$$\begin{aligned}\frac{ds}{dt} &= -s(t) \frac{e_0 k_2}{K_m + s(t)} \\ c(t) &= e_0 \frac{s(t)}{K_m + s(t)}\end{aligned}\tag{26}$$

On remarque que la dernière équation n'est autre que l'équation (??) obtenue dans le cadre de l'approximation quasi-stationnaire. La première équation donne t en fonction de s soit $s(t)$

$$K_m \ln \frac{s(t)}{s_0} + s - s_0 = -\frac{k_2}{k_1} t\tag{27}$$

et la concentration de réactant décroît pour $t \rightarrow \infty$ de façon exponentielle

$$s(t) \propto \exp \left[\frac{1}{K_m} \left(s_0 - \frac{k_2}{k_1} t \right) \right]\tag{28}$$

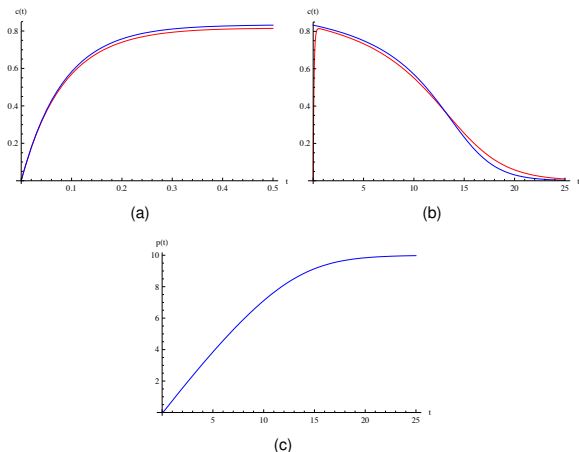


Fig.: Solutions du système(??) lorsque $k_{-1} = k_{+1} = k_2 = e_0 = 1$ avec $s_0 = 10$ (d'où $\epsilon = 0.1$). En (a) est représentée en bleu la concentration $c(t)$ aux temps courts (Cf. Eq. (??)) avec la solution exacte de (??) représentée en rouge. En (b), cette solution est représentée aux temps longs (solution du système (??) en bleu comparé avec celle du système original (??) en rouge. En (c), la solution $p(t)$.

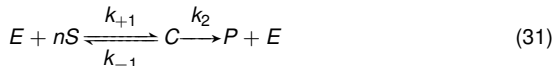
Il nous sera utile de considérer la réaction enzymatique de Michaelis-Menten (??) mais, cette fois, en considérant que la concentration de substrat est maintenue constante (il suffit d'invoquer un autre mécanisme qui maintient sa concentration constante). La concentration s devient maintenant un paramètre qu'il est possible de faire varier. La vitesse de réaction du produit p est alors

$$\frac{dp}{dt} = V_{max} \frac{s}{K_m + s} \quad (29)$$

qui peut être généralisé comme

$$\frac{dp}{dt} = V_{max} \frac{s^n}{K_m + s^n} \quad (30)$$

où n est un exposant arbitraire appelé dans la littérature coefficient de Hill qui traduit les effets coopératifs pour $n > 1$. Une possibilité pour obtenir cette équation avec un entier n est de modifier l'équation de Michaelis-Menten en supposant



où n molécules de substrat participent à la réaction tout en maintenant la concentration constante. Cette approche suppose la rencontre de $n + 1$ molécules, ce qui est très improbable pour n grand, mais nous verrons que de tels exposants peuvent être obtenus en contractant plusieurs réactions chimiques pour avoir une réaction effective.

Ajustement au modèle de Hill qui montre différentes valeurs de n avec des K_m différents

$$\frac{dp}{dt} = V_{max} \frac{s^n}{K_m + s^n} \quad (32)$$

Il est d'usage d'avoir des entiers n qui sont des nombres réels bien que le modèle n'est plus aucun sens dans ce cas.

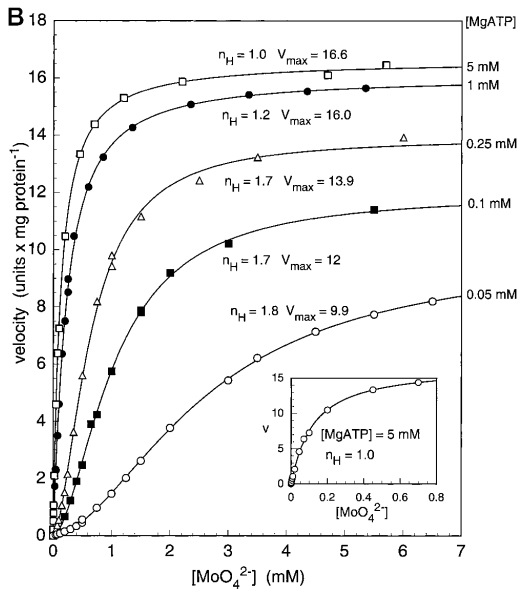
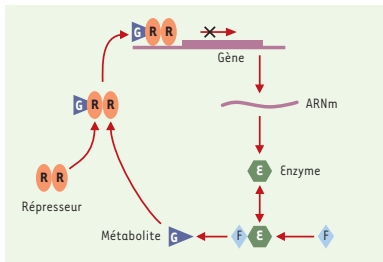


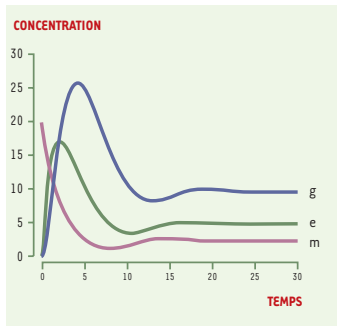
Fig : D'après[?]

Le modèle de Goodwin décrit l'un des systèmes de régulation les plus classiques, c'est-à-dire le schéma réactionnel d'une boucle de contre-réaction négative (inhibition) par le produit d'un gène. On considère un enzyme E , un répresseur R et deux métabolites F et G . Le répresseur forme un dimère avec G pour former un complexe qui est capable de bloquer la transcription de la protéine E en s'accrochant sur le site d'initiation de la transcription. Les variables suivantes permettent de raffiner le modèle :

- 1 La variable m représente la concentration d'ARN messager : cette variable mesure le taux de transcription.
- 2 les variables e et g sont les concentrations de E et du co-répresseur G .



(a)



(b)

FIG.: À gauche, schéma réactionnel du modèle de Goodwin. À droite, variation des concentrations en fonction du temps pour des conditions initiales arbitraires. On remarque que l'on atteint un état stationnaire.

En suivant la figure ??, le système dynamique peut être mis sous la forme suivante

$$\begin{aligned}\frac{dm}{dt} &= K_1 R(g) - \gamma_1 m \\ \frac{de}{dt} &= K_2 m - \gamma_2 e \\ \frac{dg}{dt} &= K_3 e - \gamma_3\end{aligned}\tag{33}$$

où les $K_{i=1,2,3}$ sont des taux de synthèse et les $\gamma_{i=1,2,3}$ sont les taux de dégradation.

La fonction $R(g)$ est introduite « à la main » pour décrire comment la transcription dépend de la concentration de co-répresseur. On utilisera ici une forme phénoménologique

$$R(g) = \frac{\theta^n}{\theta^n + g^n} \quad (34)$$

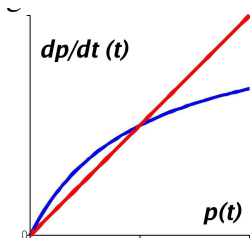
où θ et n sont des paramètres. On supposera $n \gg 1$ de telle sorte que l'Eq. (??) définit un seuil pour la concentration g en-deçà du quel la transcription est active et au-delà du quel elle est bloquée. Cette fonction permet d'atteindre un état stationnaire avec des concentrations différentes de zéro.

On introduit 2 choses :

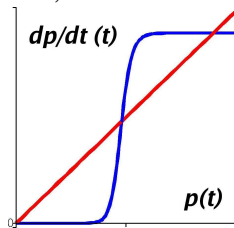
- 1 Une boucle de contre-réaction $p \propto s$ (processus auto-catalytique, p est impliqué dans sa propre production)
- 2 Une dégradation pour p .

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V_{max} s^n}{K_m^n + s^n} - \lambda p \quad (35)$$

Etat stationnaire lorsque $dp/dt = 0$ (courbe bleue = courbe rouge)



Si $n = 1$: 1 état stable possible (l'état à $p = 0$ est instable)



Si $n > 1$: 2 états stables possibles (séparés par un état instable). Possibilité d'une bascule biochimique si $n > 1$ est suffisamment grand.

Il n'est pas souhaitable de construire des modèles prenant en compte toutes les variables et nous devons nous restreindre à un nombre minimal tout en gardant les ingrédients essentiels. On reprend le modèle de Goodwin et on suppose maintenant que la protéine est **directement** impliquée dans la répression de son gène

$$\frac{dx}{dt} = k \frac{\theta^n}{\theta^n + x^n} - \gamma x. \quad (36)$$

Alors : il existe un unique point fixe asymptotiquement stable. Il n'y a **pas** d'oscillation.

Supposons maintenant que l'expression de la protéine met un temps τ

$$\frac{dx}{dt} = k \frac{\theta^n}{\theta^n + x^n(t - \tau)} - \gamma x. \quad (37)$$

Alors, si et seulement si $n > 1$, il peut exister des oscillations en fonction des paramètres.

- 1 Organisation et dynamique des réseaux encore très mal connues (surtout chez les eukaryotes)
- 2 Nous avons négligé la diffusion : les espèces ne sont pas homogènes.
- 3 Further Reading : An introduction to systems Biology (U. Allon)

Introduction à la physique des membranes et des vésicules

Bertrand Fourcade

16 juin 2014

Plan

Introduction

Un exemple :les globules rouges

Introduction géométrique à la courbure

Figure de Myelin (onduloïde)

Élasticité

Élasticité d'une monocouche

Élasticité d'une bicouche

Transition de phase et forme des vésicules

Membranes fluctuantes

Expérience de micropipette :aire cachée dans les fluctuations

Membranes près d'une paroi :Forces d'Helfrich

Membranes en adhésion

Bibliographie41

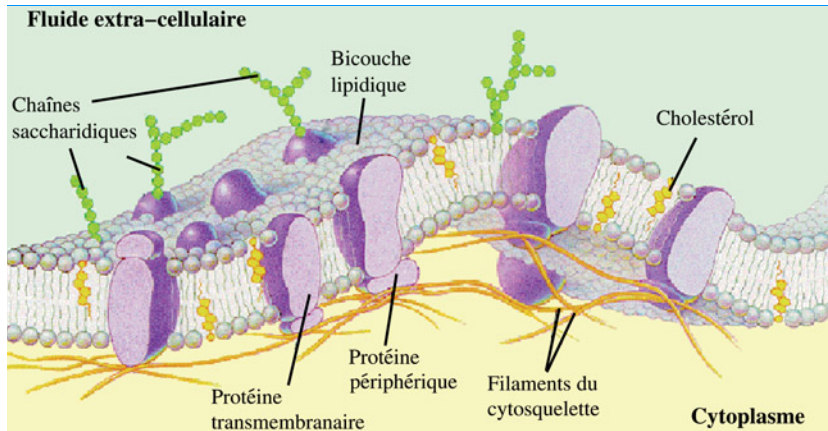


FIG.: Schéma d'une membrane plasmique. Celle-ci utilise le mode d'auto-assemblage de phospholipides en bicouches lipidiques. En présence d'eau, les queues des phospholipides cherchent à diminuer leur contact avec les molécules d'eau et elles s'organisent en bicouches d'où sont exclues les molécules d'eau. Comme les deux bords sont toujours exposés pour une surface libre, la bicouche se referme sur elle-même pour former un sac flexible. L'ordre de grandeur de l'épaisseur de la bicouche est de 5 nm . D'après Greig Geibel, <http://sun.menloschool.org/>

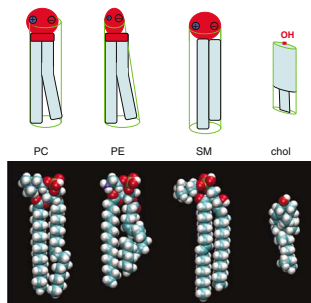


FIG.: Schéma montrant la structure des phospholipides usuels. La structure est plus ou moins cylindrique et la taille des têtes polaires varie en passant de PC (phosphatidylcholine), PE (phosphatidylethanolamine) dont la forme est plutôt conique, et SM (sphingolipid sphingomyelin) qui a une grande affinité pour le cholestérol (d'après Ref. [8]).

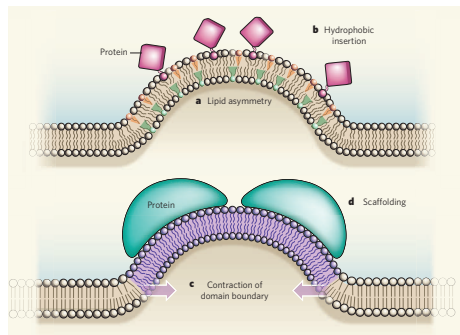
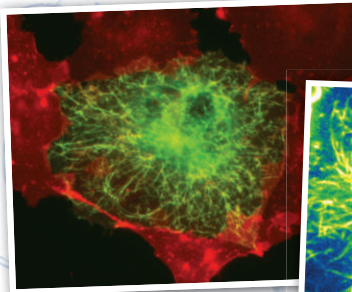


Figure 1 | Mechanisms of bending in lipid bilayers. **a**, Lipid asymmetry. This occurs when each monolayer is enriched with lipid molecules of different shapes (such as the orange and green molecules shown) and/or when one monolayer contains more lipid molecules than the other. **b**, Proteins cause membrane asymmetry by inserting their hydrophobic domains into one side of the bilayer. **c**, When bilayer matrices contain domains consisting of different lipid phases (such as the ordered (brown) and disordered (purple) regions shown), the boundaries between the domains tend to contract, causing the intervening region to bend. **d**, Finally, proteins bound to the bilayer can act as scaffolds that force curvature on the membrane. Yu *et al.*² report a synthetic model of membranes in which both hydrophobic insertion and domain-boundary contraction bring about bending.

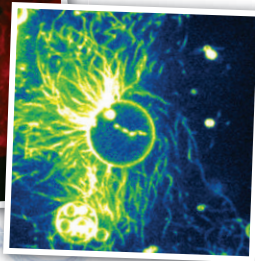
Courber la membrane requiert une énergie de l'ordre de $20k_B T$. Ici mécanismes qui permettent de courber une membrane fluctuante pour faire des sphères ou des tubes → systèmes reconstitués.

On sait maintenant qu'il existe des protéines qui sont des senseurs de courbure : l'auto-organisation dépend de la mécanique et de la géométrie[3]



BAR domains conjure tubules out of cell membranes.

320



Antony's recent work has focused on one enzyme, called ArfGAP1, that detects the tight curve on transport vesicles and directs the removal of their protein coat before they can fuse with their destination membrane. His team showed that ArfGAP1 has greater activity when bound to highly curved membrane spheres — with the same diameter as transport vesicles — than to ones with a broader diameter and a gentler curve¹¹. The

K
b
1.
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

La cellule vivante la plus simple du point de vue mécanique

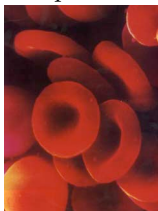
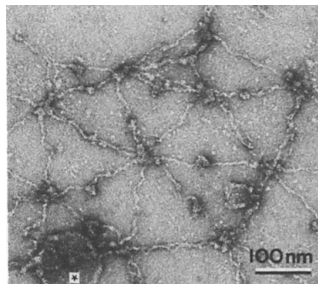


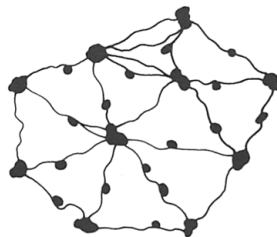
FIG.: Image de globules rouges humains sains (hémathie) par microscopie électronique.

Hémathies

La paroi des hémathies n'est pas constituée uniquement d'une bicouche lipidique. Il existe un réseau polymère de **spectrine**. Ce réseau est bi-dimensionnel et il est ancré dans la membrane.



(a)



(b)

FIG.: Visualisation du réseau hexagonal de spectrine visualisé par microscopie électronique. Les molécules de spectrines connectent les vertex d'actine. Le cytosquelette est ainsi riveté à la membrane par des protéines spécialisées. L'image de droite est une vue de l'artiste du réseau dont le pas fait environ 200 nm. Bien que motif le plus courant soit constitué d'hexagones, on remarque la présence de pentagones.[?]

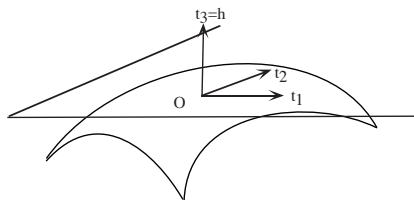
Introduction géométrique à la courbure

Hypothèses

- (i) Les membranes sont **fluides**. En particulier, aucune résistance au cisaillement. Le coefficient de diffusion est $\approx 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s} \Rightarrow$ Il faut environ 1 seconde à un phospholipide pour inspecter une vésicule.
- (ii) L'épaisseur de la bicouche ($\approx 60 \text{Å}$) est très inférieure à la taille caractéristique de la vésicule.

La membrane est vue comme une surface 2D avec 2 tangentes et 1 normale. Le tenseur de courbure donne la variation de l'orientation de la normale n :

$$\frac{\partial n}{\partial x_i} = R_{i,j} t_j \quad (1)$$



Une formule utile

On considère un plan contenant la normale. Ce plan a une intersection avec la surface qui est une courbe. Soit R le rayon de courbure de cette courbe plane. Faisons tourner ce plan d'un angle ϕ autour de la normale :

$$\frac{1}{R(\phi)} = \frac{\cos^2 \phi}{R_{max}} + \frac{\sin^2 \phi}{R_{min}} \quad (2)$$

Les invariants géométriques vont nous permettre de construire une énergie libre

Il existe deux invariants vis à vis de la re-paramétrisation de la surface (trace et déterminant)

$$\text{Courbure moyenne: } H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (3)$$

$$\text{Courbure gaussienne: } K = \frac{1}{R_1 R_2} \quad (4)$$

Conséquence : origine de l'effet bilame

$$\frac{4\pi(R+d)^2 - 4\pi(R-d)^2}{4\pi R^2} = \frac{4d}{R} \quad (5)$$

donc varier les densités de façon différentielle entre l'intrados et l'extrados est couplé à la courbure

Important

Courbure = extension relative de la surface externe par rapport à la surface neutre et compression relative de la surface interne.

Un théorème dû à Gauss :

$$\int d\mathcal{S} \frac{1}{R_1 R_2} = 4\pi(1 - g) \quad (6)$$

où g est le nombre de trous (c.-à-d. des anses. Une chambre à air est un tore à un trou)

Conséquence

On ne peut pas construire une énergie avec la courbure gaussienne, car celle-ci compte tout au plus le nombre de trous et elle indépendante de la forme de la surface lorsque celle-ci est **fermée**. Ce terme ne peut changer que si la topologie change par **fusion** ou fission de membrane. Il s'agit d'un événement très rare pour une membrane phospholipidique. La fusion ou la fission est contrôlée par une machinerie dans les systèmes biologiques (snares).

L'énergie de flexion est invariante d'échelle

Conséquence 1

Pour une sphère de rayon R

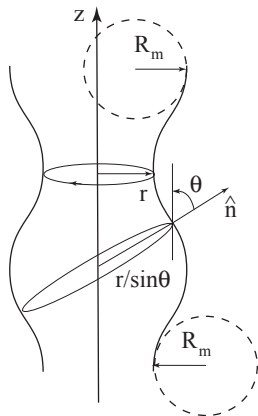
$$E_{courbure} = \frac{1}{2} \kappa 4\pi R^2 \frac{1}{R^2} \quad (7)$$

qui est indépendant du rayon R de la sphère. Que R soit grand ou petit l'énergie de flexion est la même !

Conséquence 2

Mais pour une surface arbitraire, les deux rayons de courbures peuvent avoir des signes arbitraires : on peut courber sans voir d'énergie (surfaces minimales)

Exemple des formes à symétrie de révolution : les onduloïdes



Exemple de surface de révolution engendrée par une courbe en rotation autour de l'axe z . La distance par rapport à l'axe est notée r . Le rayon de courbure suivant la direction des parallèles est le rayon du cercle tangent et contenant la normale \hat{n} . Le cercle de courbure est donc incliné d'un angle θ par rapport à l'axe z . Les deux cercles en pointillé illustrent les deux cas possibles de position du centre de courbure pour le calcul dans la direction des parallèles. Le centre est soit à l'intérieur de la surface, soit à l'extérieur. Le rayon de courbure peut donc avoir un signe arbitraire.

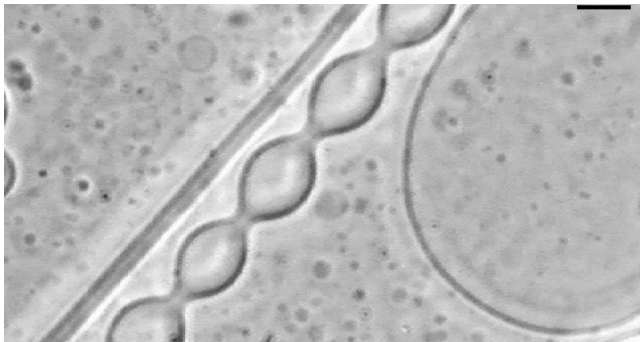


FIG.: Figure d'équilibre d'une onduloïde. La barre représente $10\ \mu m$. D'après la référence [2].

Le problème d'une vésicule est très **différent** de celui d'une goutte liquide qui est dominée par la capillarité (transfert de molécules du volume à la surface)

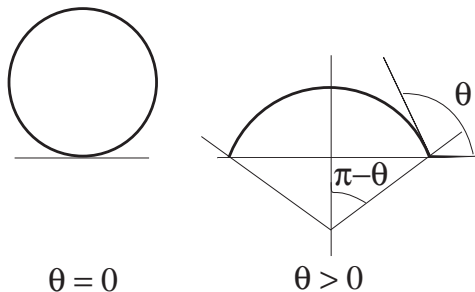


FIG.: Schéma du goutte déposée sur un substrat. En absence de gravité, la forme de la goutte est un hémisphère. L'angle de mouillage θ est relié au rayon de l'hémisphère dont le rayon d'adhésion est $r = R \sin \theta$. Lorsque $\theta = 0$ la goutte ne mouille pas le substrat. Lorsque $\theta = \pi$, la goutte forme un film et on est en situation de mouillage total.

Unités

Pour une goutte la capillarité domine (tension de surface). Pour une vésicule la tension de surface a un sens physique différent : il est associé à l'étirement de la membrane et son effet est faible devant celui de la flexion

- (i) Tension de surface σ : $1 \text{ nN}/\mu\text{m} = 1 \text{ mN}/\text{m} = 1 \text{ dyn}/\text{cm}$ ($1 \text{ dyn} = 10^5 \text{ N}$). La tension de lyse d'une membrane est de l'ordre de quelques mN par nanomètres.
- (ii) Module de flexion $\kappa \approx 20 - 40k_{\text{B}}T$ pour des vésicules et $3k_{\text{B}}T$ pour des membranes fluctuantes.

Longueur caractéristique en-deçà de laquelle la flexion domine la fonctionnelle d'énergie

$$l = \sqrt{\frac{\kappa}{\sigma}} \simeq 10 \text{ nm} - 10 \mu\text{m} \quad (8)$$

⇒ très petite dans le cas des gouttes liquides, de l'ordre de grandeur de la taille d'une vésicule pour les membranes.

Élasticité d'une monocouche

Conséquence

Pour une surface **d'aire constante**, nous écrivons donc

$$\mathcal{E} = \frac{\kappa}{2} \int d\mathcal{S} (c_1 + c_2)^2 \quad (9)$$

Généralisation

Cette formule se généralise au cas où le milieu a une courbure naturelle R_0 - on dit courbure spontanée dont l'origine est physico-chimique - qui sert alors de référence (voir joint torique par ex.)

$$\mathcal{E} = \frac{\kappa}{2} \int_0^l ds \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_0} \right)^2 \quad (10)$$

et pour une surface nous écrivons :

$$\mathcal{E} = \frac{\kappa}{2} \int d\mathcal{S} (c_1 + c_2 - c_0)^2 \quad (11)$$

Élasticité d'une bicouche

Contraintes

Le minimum d'énergie de flexion est une sphère. Il existe **2** contraintes : nous minimisons l'énergie de flexion à **Aire totale et Volume tous deux constants**, donnés au moment de la formation de la vésicule. L'aire est fixée par le nombre de phospholipides (pas d'échange) et le volume est constant sans cela il apparaîtrait une pression osmotique qui doit rester très faible.

Fonctionnelle d'énergie

La forme minimise un potentiel

$$\mathcal{E} = \frac{\kappa}{2} \int d\mathcal{S} (c_1 + c_2 - c_0)^2 - p\mathcal{V} + \sigma\mathcal{A} \quad (12)$$

où p et σ sont deux paramètres de Lagrange baptisés pression et tension de surface.

Généralisation

Pour une bicouche, la différence d'aire est fixée par la courbure.

Considérons deux sphères concentriques :

$$\begin{aligned} \Delta A &= 4\pi(R+d)^2 - 4\pi R^2 = 4\pi R^2 \times 2 \frac{d}{R} \\ &= 2d \underbrace{\int d\mathcal{A} H}_{\text{courbure moyenne}} \end{aligned} \quad (13)$$

Conduit au modèle A.D.E.

$$\mathcal{E}_{\mathcal{A}\mathcal{D}\mathcal{E}} = \frac{\kappa}{2} \int d\mathcal{S} (c_1 + c_2 - c_0)^2 + \frac{\pi\bar{\kappa}}{Ad^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (14)$$

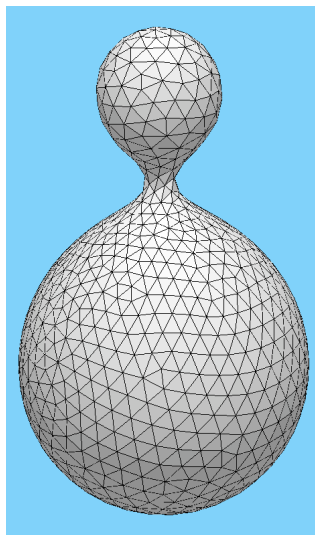
Beaucoup de solutions \rightarrow bifurcations entre formes qui minimisent l'énergie.

Exemple de formes

On peut contrôler l'aire totale de la vésicule en jouant sur **l'expansion thermique de la membrane**. Imaginez que nous partions d'une sphère et que l'aire \mathcal{A} augmente. Ajouter à la sphère mère une sphérule de taille $2R_0$ ne coûte aucune énergie car son énergie est **nulle** si le système possède une courbure spontanée R_0 :

$$\int d\mathcal{A} \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_0} \right)^2 = 0 \quad (15)$$

→ Bifurcation de bourgeonnement



Bourgeonnement par tension de ligne entre deux phases

Une interface entre deux phases coûte une énergie. Si nous imaginons que la membrane contient deux espèces de phospholipides chimiquement incompatibles, la forme de la vésicule peut réagir en diminuant la longueur de la ligne de contact entre les deux phases. La ligne de contact étant concentrée au niveau du col connectant la sphérule à la vésicule mère, la membrane **décroit** l'énergie associée à l'interface entre les deux phases en bourgeonnant.

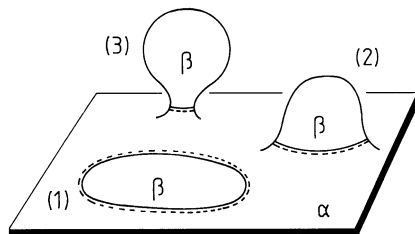
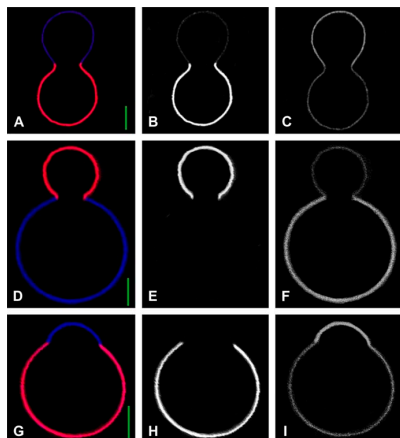


Fig.1. — Budding of the membrane domain β embedded in the membrane matrix α . The edge is indicated by the full-broken line. The length of this edge decreases during the budding from (1) to (3).



Imagerie bi-photonique d'une coexistence de phase entre un phase liquide ordonnée et une phase liquide désordonnée dans la membrane d'une vésicule. Il s'agit en fait d'un mélange ternaire avec du cholestérol de deux types de phospholipides dont les chaînes ont des longueurs différentes. Les domaines des deux phases sont imagés à l'aide de chromophores qui ont des affinités très différentes pour les deux phases. Les 3 vésicules correspondent à des fractions d'aire occupées par les deux phases différentes. Les colonnes 2 et 3 sont des expériences où seul l'un des deux domaines est imagé. D'après[1].

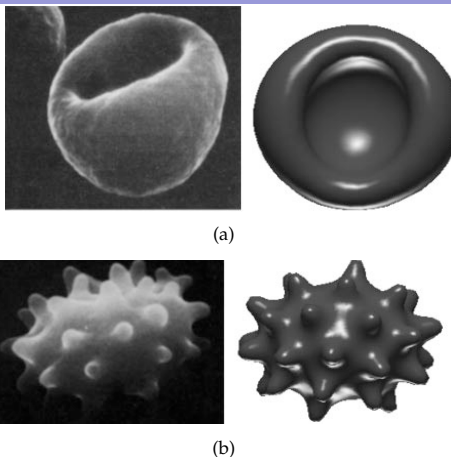


FIG.: La figure (a) présente un globule rouge dont la forme est un stomatocyte. Cette forme est un minimum de l'énergie de courbure lorsque $\Delta A_0 < 0$. La forme (b) est une forme en echinocyte. Cette forme n'est pas un minimum de l'énergie de courbure seule, car la forme des spicules est déterminée par les efforts élastiques du réseau de spectrine. D'après la référence [6].

Membranes Fluctuantes

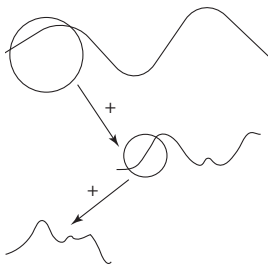


FIG.: On représente les fluctuations d'une membrane à différentes échelles. Un zoom optique permet de distinguer les fluctuations de longueur d'onde de plus en plus petites. Lorsque le grossissement du zoom n'est pas suffisant, les fluctuations des petites échelles ne sont pas observables et les ondulations sont lissées. Augmentant le grossissement du zoom, l'amplitude des fluctuations de longueur d'onde de plus en plus petite apparaît. On peut représenter la longueur d'onde de coupure comme le grossissement maximum imposé par les limites du microscope mais qui ne permet pas l'observation aux toutes petites échelles.

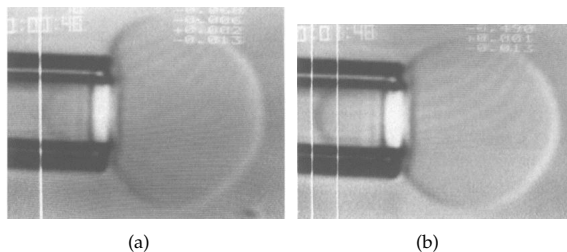


FIG.: Exemples d'aspiration d'une vésicule géante à l'intérieur d'une micropipette. La différence de pression entre les deux images est passée de $4 \cdot 10^{-4} \text{ dyn/cm}$ à 0.2 dyn/cm , ce qui se traduit par une longueur de langue aspirée plus grande dans le deuxième cas (D'après [4]).

Principe de la mesure

$$p_i - p_m = \frac{\sigma}{R_p} \quad (16)$$

$$p_i - p_e = \frac{\sigma}{R_e}$$

on trouve :

$$p_e - p_m = \sigma \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_e} \right) \quad (17)$$

ce qui permet de déterminer la tension σ une fois les autres quantités mesurées.

Le diamètre de la micro-pipette étant connu, il est aussi possible d'évaluer l'aire de membrane « aspirée » par la différence de pression, car la longueur de la langue dans la micro-pipette est connue. On a donc une mesure directe de l'aire absorbée dans les fluctuations thermiques en fonction de la tension de surface contrôlée par la différence de pression.

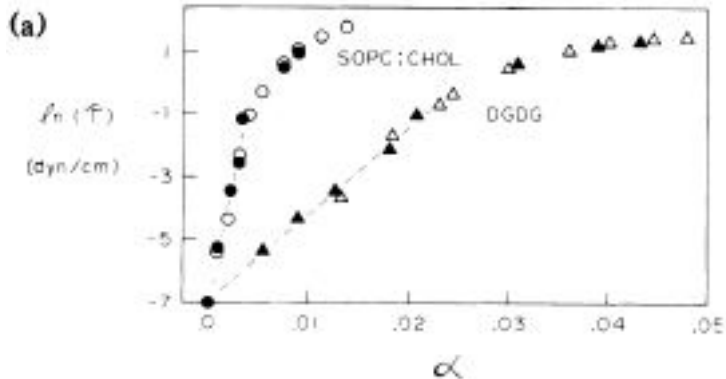


FIG.: Mesure de la fraction de l'aire absorbée dans les fluctuations en fonction de la tension de surface. On note que la tension est portée en échelle logarithmique. Les deux courbes correspondent à des vésicules de composition chimique différente. Les faibles tensions repassent les fluctuations thermiques et donnent un comportement linéaire. Dans le régime des tensions plus importantes, la mesure sonde les propriétés d'extension mécaniques de la membrane en faisant varier l'aire par tête polaire.

On sait maintenant que les canaux ioniques changent les fluctuations des membranes. Ces membranes sont dites actives car les canaux pour fonctionner consomment de l'énergie sous la forme d'ATP et ils appliquent des forces sur la membrane

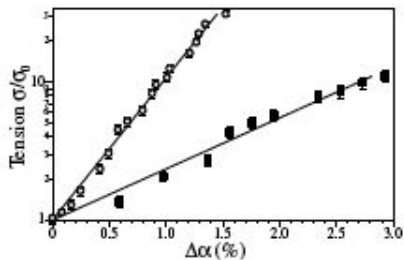


FIG.: Données expérimentales en échelles semi-logarithmique pour l'excès d'aire en fonction de la tension. La courbe avec des symboles \square correspond à une membrane passive. Celle avec des symboles \circ correspond au même système en présence d'ATP (d'après ref. [5])

Comme d'habitude, les fluctuations sont décrites à partir des modes de Fourier. Nous simulons la forme d'une vésicule en introduisant des conditions périodiques de période L dans le plan (x,y) de référence. En deux dimensions, les coefficients de Fourier sont définis par

$$\tilde{h}_{\mathbf{q}} = \int d^2x h(x,y) \exp[-i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}] \quad (18)$$

et

$$h(x,y) = \frac{1}{L^2} \sum_{\mathbf{q}} \tilde{h}_{\mathbf{q}} \exp[i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}] \approx \frac{1}{(2\pi)^2} \int d^2q \tilde{h}_{\mathbf{q}} \exp i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r} \quad (19)$$

ce qui redonne bien

$$h(x,y) = \sum_{q'} \frac{1}{L^2} \underbrace{\int d^2r \exp [i(\mathbf{q}\cdot\mathbf{r} - \mathbf{q}'\cdot\mathbf{r})]}_{L^2 \delta_{\mathbf{q}-\mathbf{q}',0}} h(u,v) = h(x,y) \quad (20)$$

Les longueurs d'onde associées aux fluctuations ne peuvent être arbitrairement petite, car l'épaisseur de la membrane impose un « cut-off » a en-deçà duquel l'élasticité de flexion n'est pas valable. La première zone de Brillouin sera alors définie comme la couronne sphérique

$$\frac{2\pi}{L} \leq |q| \leq \frac{2\pi}{a} \quad (21)$$

$$\mathcal{P}(\tilde{h}_{\mathbf{q}}) = A_q \exp \left[-\frac{q^2 (\sigma + \kappa q^2)}{L^2 k_B T} \right] \quad (22)$$

où A_q est une constante de normalisation calculée à partir de la condition

$$\int d\tilde{h}_{\mathbf{q}} \mathcal{P}(\tilde{h}_{\mathbf{q}}) = 1 \quad (23)$$

Donc, fluctuations des modes dominées par la flexion si

$$q > \sqrt{\frac{\sigma}{\kappa}} \quad (24)$$

i.e. presque toujours le cas pour une vésicule.

Membranes près d'une paroi : Forces d'Helfrich

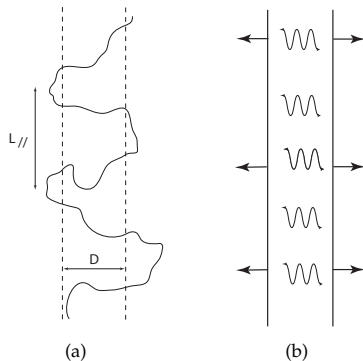


FIG.: Une membrane fluctuante est caractérisée par des fluctuations transverses de taille D et distantes de $L_{//}$. Prise en sandwich entre deux parois distantes de D , chaque excursion transverse de taille D entre en collision avec les parois et peut être vu comme un degré de liberté. L'effet des parois est de diminuer l'entropie de fluctuations de la membrane, ce qui se traduit par une pression entropique effective qui tend à repousser les parois.

Résultat La force est **répulsive** :

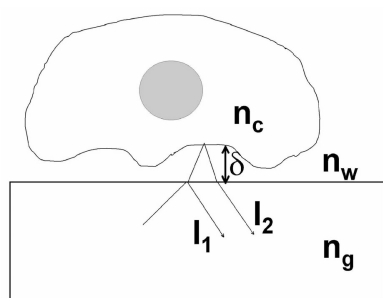
$$V(D) = \frac{(k_B T)^2}{16\pi^2 \kappa D^2} \quad (25)$$

de même ordre de grandeur que les forces de VdW qui sont elles attractives

$$V_{\text{VdW}} = - \frac{A_H}{d^2} \quad (26)$$

Par définition, A_H est la constante de Hamacker.

Comment une cellule palpe son substrat : les premiers instants d'une rencontre[7]



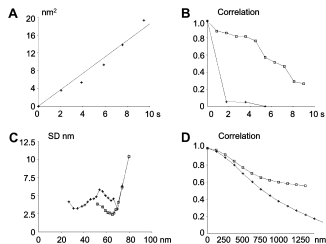


FIGURE 7 Quantitative description of cell membrane transverse fluctuations during contact extension. (A) A representative cell imaged with ~ 1 Hz frequency during contact formation. The squared displacement per pixel was plotted versus time after subtracting the overall displacement (corresponding to decrease of average cell-to-surface distance). The plot is fairly linear. Correlation coefficient is 0.991. (B) Lifetime of membrane undulations: the time dependence of correlation between two sequential membrane maps (\square) on a typical cell reveals 50% decrease of correlation during ~ 8 s. Crosses represent displacements of a given membrane point reveal no detectable temporal correlation, suggesting that membrane deformations are driven by random movements with higher than 1 Hz frequency (in line with Fig. 3 B). (C) Dependence of the amplitude of vertical membrane displacements (as imaged in Fig. 6 C) on distance to the adhesive surface. Squares represent onset of contact. Crosses represent 130 s after contact initiation. D shows correlation length of cell contour. Both membrane images (\square) and local displacements during a 2.7 s interval (crosses) display marked spatial correlation with a 50% decrease at $1 \mu\text{m}$ separation.

On note l'augmentation des fluctuations à courtes distances : les fluctuations sont **actives**

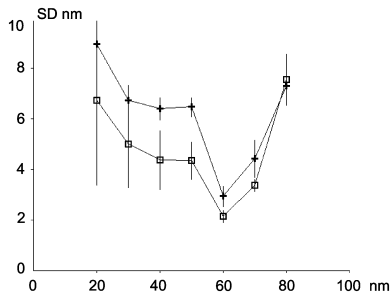


FIGURE 10 Effect of cytochalasin D on membrane fluctuations near a surface. Seven control cells (□) and eight cytochalasin D-treated cells (+) were monitored for determination of membrane topographical and fluctuation maps. The standard deviation of membrane height, representing a fluctuation amplitude, was determined on separate groups of point with common distance to the surface. Cytochalasin treatment did not substantially influence fluctuations at 60–80 nm separation, but this seemed to increase fluctuations for smaller distances (the difference was significant for 50 nm separation with Student's *t*-test).

- [1] T. Baumgart, ST. Hess, and WW. Webb. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425 (6960):821–824, Oct 2003. URL <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=14574408>.
- [2] S. Chaïeb and S. Rica. Spontaneous courvatura-induced pearling instability. *Phys. Rev. E*, 58(6):7733–7737, 1998.
- [3] Guillaume Drin, Vincent Morello, Jean-François Casella, Pierre Gounon, and Bruno Antony. Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science*, 320(5876):670–3, May 2008. doi: 10.1126/science.1155821.
- [4] Evans E and Rawicz W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes., 1990.
- [5] P Girard, J Prost, and P Bassereau. Passive or active fluctuations in membranes containing proteins. *Phys Rev Lett*, 94(0031-9007):088102, 2005.
- [6] Gerald Lim H W, Michael Wortis, and Ranjan Mukhopadhyay. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(0027-8424):16766–9, 2002.

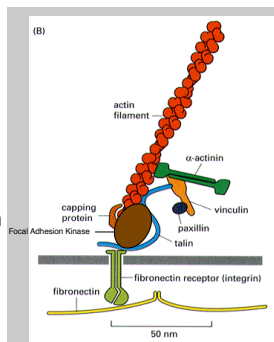
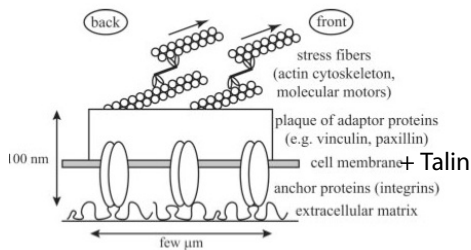
- [7] A Pierres, Benoliel A.M., D Touchard, and P. Bongrand. How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. *Biophys J*, 94:1–9, 2008.
- [8] Gerrit van Meer. Cellular lipidomics. *EMBO J*, 24(0261-4189):3159–65, 2005.

Modelling actin-membrane machinery and mechano- sensitivity in cell adhesion: From biomimetic systems to living cells II

Bertrand Fourcade
University of Grenoble, France

2 juillet 2012

Mature Focal Adhesion plaques

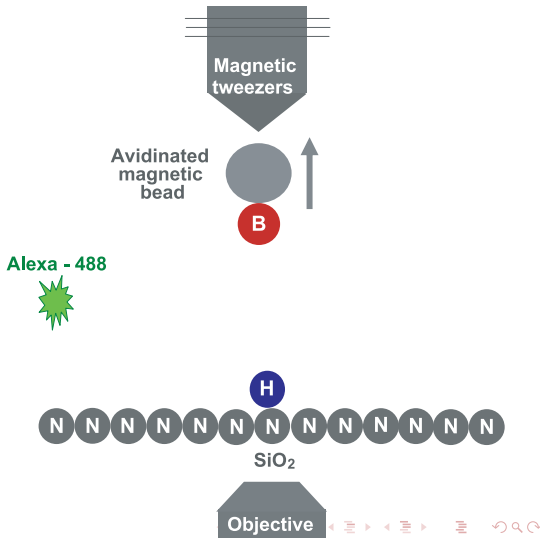


Recruitment of proteins (thus signaling) is mechanical force dependent

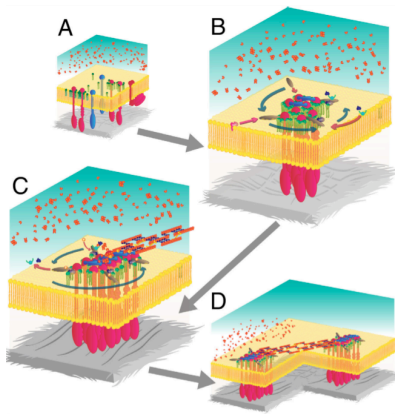
REPORTS

Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding

Armando del Rio,¹ Raul Perez-Jimenez,² Ruchuan Liu,² Pere Roca-Cusachs,¹ Julio M. Fernandez,³ Michael P. Sheetz^{1*}



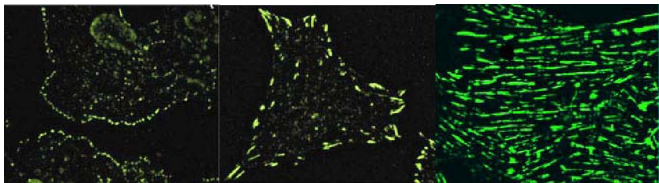
Schematic view of the signaling pathways leading to FA



Blue arrows represent the spatiotemporal sequence of structure assembly. Pink arrows indicate protein recruitment.

Sequences of organization of focal adhesion complexes. (A) Initial stages : Integrins bind to components of the ECM (grey), leading to clustering of receptors into PtdIns(4,5)P₂-enriched areas of plasma membrane. (B) In early spreading adhesions at the cell periphery, the Arp2/3 complex and WASP are targeted to adhesions by FAK. (C) Talin is recruited to adhesions, allowing integrin-ECM linkages to be functionally coupled to actomyosin; this enables actomyosin contractility to affect adhesion reinforcement and subsequent maturation. Actin filaments can be crosslinked by α -actinin. Myosin II incorporates into the α -actinin-crosslinked actin-filament bundles. (D) The collective dynamics of focal adhesions can be imaged by the actin-stress-fiber-mediated connection of focal adhesions. [1]

Focal adhesion: sensing, maturation etc.





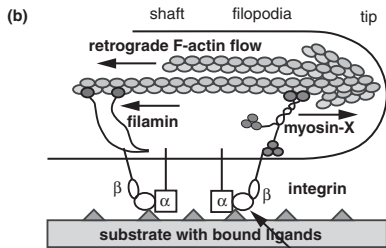
complexes focaux  adhérence focales  adhérences fibrillaires

FIG.: From focal complexes to fibrillar adhesion (time scale 1h). Cells probe their environment by applying a force at contact points: Cells are **tense** bodies.

Emerging integrin clusters underneath filopodia (nascent adhesion) form a mechanical clutch to couple the advancing F-actin networks



Different possibilities to drag integrin along the shaft of a filopodia. In the 'integrin clutch' mode, the retrograde flow of actin filaments is counteracted by integrins that bind both to actin filaments and extracellular matrix (ECM) proteins to form a clutch, and actin polymerization at the tip is used to protrude the membrane. This applies to β_1 integrin. Anterograde movement towards the tip of filopodia can be provided by myosin X

Different adhesive structures

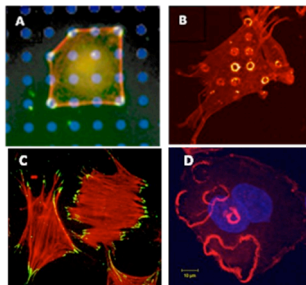
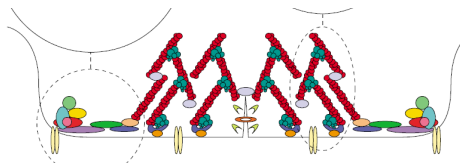
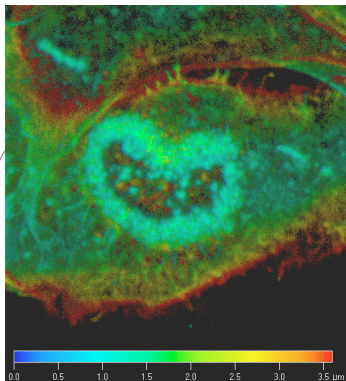


FIG.: Cells exhibit different adhesive structures[10]

Podosomes are other adhesive structures (very motile cells, cancer cells etc.)



column perpendicular to the substrate (scale 0.5 μm .)

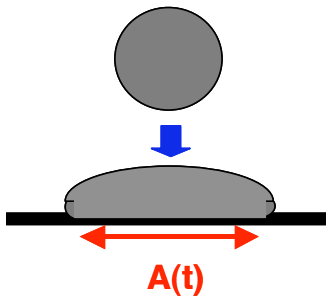


Organization of podosomes into dynamics rosettes which expand.

To study early events : Cell spreading on substrates

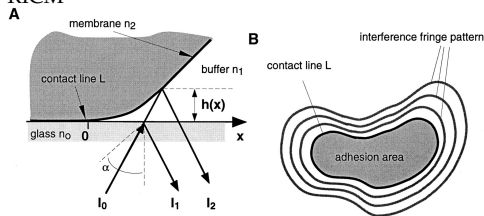
- 1 Even not motile cells spread on substrates (ex. HeLa cells)
- 2 Red blood cells[5, 11], epithelial cells[20], fibroblasts[7–9], neutrophils or monocytes[15] all spread but with different characteristic time scales and with different geometries for the contact line.
- 3 Here : Ameobian cells (Dicty). Dicty does not form stress fibers and is motile. This is a professional for phagocytosis. Time scale is the minute.

Cell Spreading



Characteristic curve: Increase of area of contact.

Reflexion Interference Contrast Microscopy : RICM



Precision is about 20 nm.



FIG.: Contact zone (white at the beginning, black at the end). Spreading is non-symmetric and precedes motility. Polarization is set before motility.

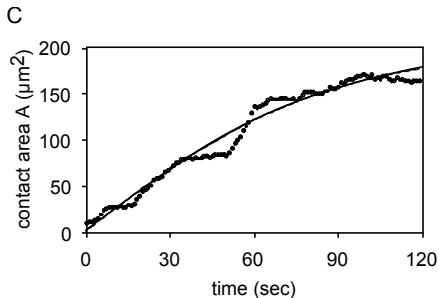
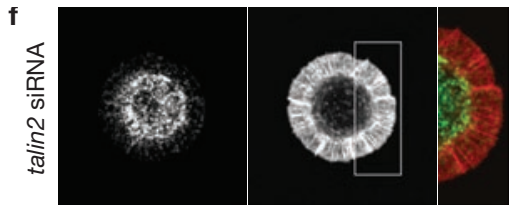
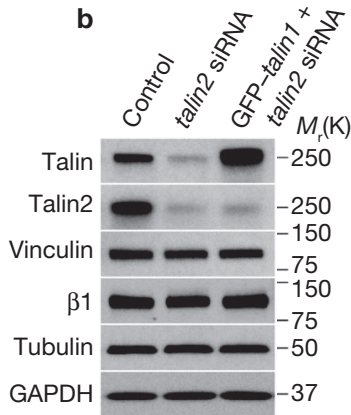


FIG.: Area of contact as a function of time. Observe large dispersion among cells. Note that spreading is bi-phasic. A linear increase is always followed by a plateau.

Talin defective cells are able to spread but adhesion is defective (no firm adhesion, the cell retracts after spreading)



(a)



(b)

Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction

Xian Zhang¹, Guoying Jiang¹, Yunfei Cai¹, Susan J. Monkley², David R. Critchley² and Michael P. Sheetz^{1,3}

Apparent increase of membrane area

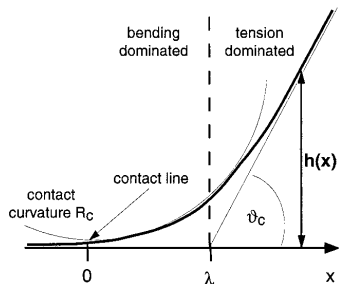


FIG.: Bending is important only near the contact zone.

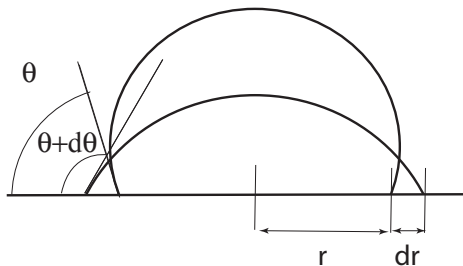


FIG.: We forget about bending. Spreading is seen as a sequence of spherical caps with contact angle θ

$$r_s \propto R_i \theta$$

$$A(\theta) \propto R_i^2 \theta^2 \quad (1)$$

→ Total (apparent) area increases : membrane must be taken out of somewhere !

Taking membrane out of a reservoir increases surface tension

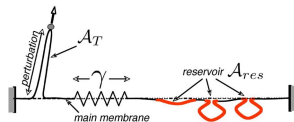
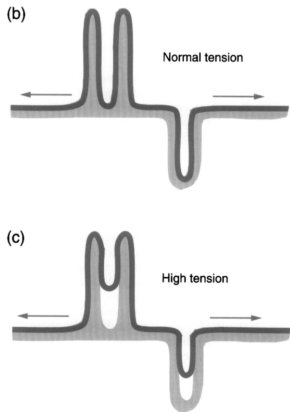


FIG.: Following Sheetz[18], surface tension is an effective parameter used to control spreading. Used in other systems to membrane-cytoskeleton adherence (see for example [17] for a composite system).

FIG.: Membrane is taken out of invaginations and folds at the sub-micrometer scales. There is also a possibility for membrane traffic.

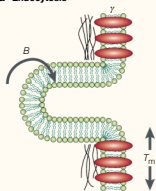
Membrane-Cytoskeleton adherence is probed using micropipette experiments with an apparent continuous adhesion potential

OPINION

Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion

Michael P. Sheetz

a Endocytosis



b Tether formation

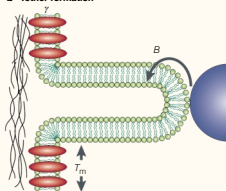


Figure 1 | The energetics of endocytic vesicle formation are similar to those of tether formation.

This diagram illustrates that the factors that contribute to the load of forming a vesicle are the same as those that contribute to forming a tether. The major factor is the membrane-cytoskeleton adhesion energy, γ , which must be overcome to separate membrane from cytoskeleton. A secondary term is the tension in the bilayer plane, T_m , which resists deformation of the membrane. Because the curvature of vesicles and tethers are similar, the force needed to bend the membrane should be similar (membrane bending stiffness, B , defines the force for a given radius of curvature²⁹). See Box 1 for details.

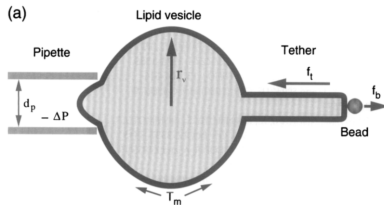
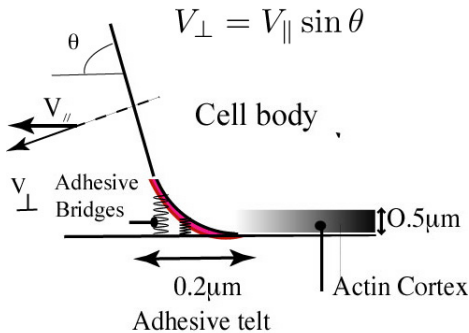


FIG.: Decrease of tension can also be induced by lipid uptake. For a physical approach, see [19]

Finding θ as a function of V_{\perp} (actin polymerization) is to first order a geometrical problem



From

$$V_{\perp} = V_{\parallel} \sin \theta \approx V_{\parallel} \theta \quad (2)$$

gets

$$A(t) \propto t \text{ For short times} \quad (3)$$

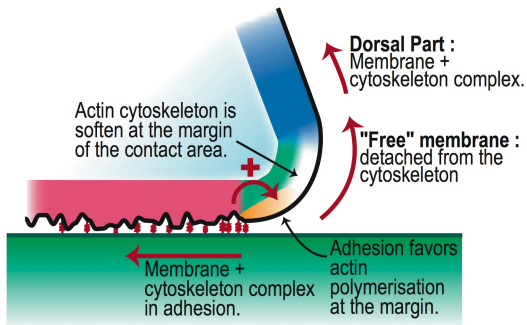
if the increase of tension is neglected. But

$$\sigma(\theta) = \sigma_0 + \frac{1}{16} C \theta^4 + \dots \text{ For circular geometry} \quad (4)$$

This gives

$$\frac{\mathcal{A}_{\text{contact}}}{\mathcal{A}_{\text{max}}} = \tanh \alpha t \quad (5)$$

where α is a parameter ($\alpha \propto C$).



The mechanics of adhesion with an elastic foundation defines **three** length scales :

- (i) The bending length $\sqrt{\kappa/\sigma}$ which tells us where curvature is important for a **free** membrane.
- (ii) The scale λ^{-1} which tells us how the membrane is bend when it is in adhesion with the substrate. This length scale appears for stress and strain in the direction **normal** to the substrate.
- (iii) Finally, λ_s^{-1} will appear naturally when we will study shear equilibrium between the cell the substrate. This length scale tells us what is the size of **coherence** for **shear** elasticity.

Vegetative wild type

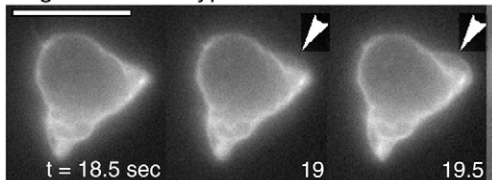


FIG.: Dicty cell motion proceeds via local rupture of the adherence between the membrane and the cytoskeleton.

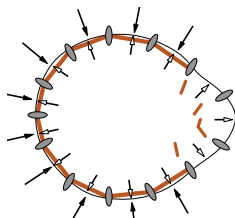


FIG.: Symmetry breaking and cell polarization

Signalisation will depend on the stress. Talin concentration is high in the adhesive belt

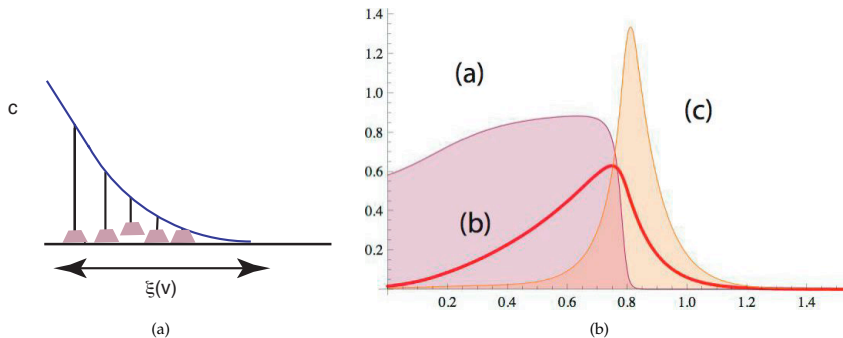
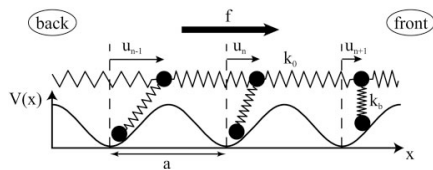
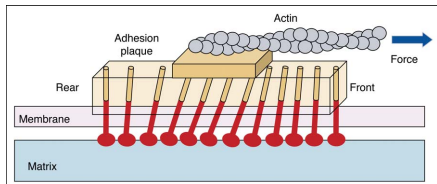


FIG.: (a) Density of bound integrins. (b) Concentration of talin. (c) Rate of actin polymerization

Stress fibers apply shear stress to focal adhesion



Growth of focal adhesion contacts are studied using the shear stresses: cell-substrate interactions are screened[4].

Consider a ribbon (height h , width b , modulus E) lying on an elastic layer of thickness h_a and of shear modulus μ_a . Let $u(x)$ the displacement along the x -direction[12]:

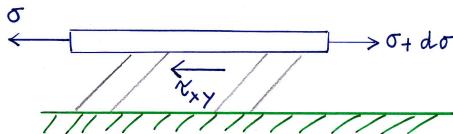
$$\tau_{x,y} = \mu_a \frac{u}{h_a} \quad (6)$$

At equilibrium, the horizontal forces balances each other

$$h \frac{d\sigma_x}{dx} = \tau_{x,y} \quad (7)$$

Or

$$\sigma_x = E \frac{du}{dx} \quad (8)$$



which means

$$\frac{d^2\sigma_x}{dx^2} = \lambda^2\sigma_x \quad (9)$$

With

$$\lambda = \left(\frac{\mu_a}{Ehh_a} \right)^{1/2} \simeq 50,100 \text{ Nm}^{-1} \quad (10)$$

being the inverse of a characteristic length scale which sets a screening length

$$\sigma_x = C_1 \exp[-\lambda x] + C_2 \exp[+\lambda x] \quad (11)$$

REMARK :

The screening length λ^{-1} decreases with increasing the shear modulus μ of the substrate.

Growth in the direction of the pulling force

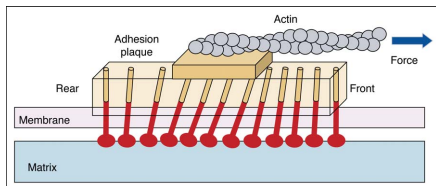


FIG.: Strain-driven mechanism for growth in the direction of the pulling force

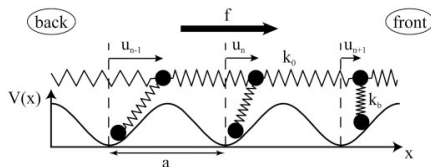


FIG.: Sliding friction model used in[2][13] to model FA growth.

We will see that relative change in density $\delta\phi(x)/\phi(x)$ is polarised in the direction of the force[13].

Assume a constant external force exerted by the actin-myosin machinery

$$f = \text{constant for } -L/2 \leq x \leq +L/2 \quad (12)$$

Then the front at $x = L$ is compressed and the back is expanded

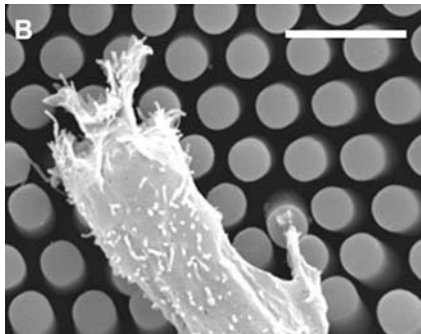
$$\frac{\delta\phi}{\phi}(x) = \frac{f}{\sqrt{k_b k_0}} \sinh(\lambda x) e^{-\lambda L/2} \quad (13)$$

since the density is maximum at $x = L/2$.

CONCLUSION:

*This example shows how the **Chemical potential** $\mu(x,t)$ depends on the elastic deformations of the mechanosensors. This chemical potential depends on the force f and on sensor compression. This coherence length has been interpreted as the size of the FA's. [6].*

Are cells sensitive to forces or to deformations?



Force sensor

The traction forces developed by cells depend strongly on the substrate rigidity. Ref. [16] has characterized quantitatively this effect on MDCK epithelial cells by using a microfabricated force sensor consisting in a high-density array of soft pillars whose stiffness can be tailored by changing their height and radius to obtain a rigidity range from 2 nN/mm up to 130 nN/mm.

Result

They find that the forces exerted by the cells are proportional to the spring constant of the pillars meaning that, on average, the cells deform the pillars by the same amount whatever their rigidity. The relevant parameter may thus be a deformation rather than a force.

Control of actin polymerization in curved geometry ...

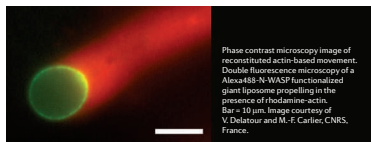
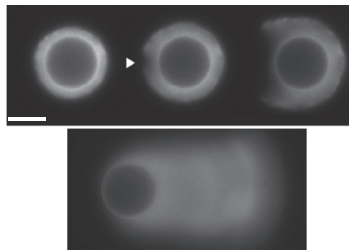
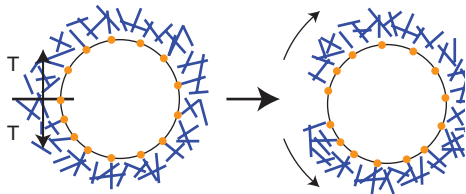


FIG.: Reconstitution of an artificial Listeria. M.F. Carrier 's group

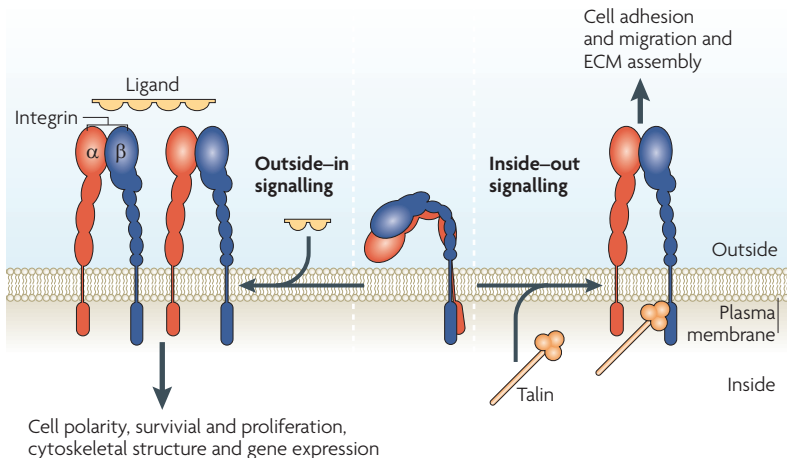
As the gel grows thicker, the tensile stress in the gel also becomes higher. Geometry gives the origin of this effect. As the gel grows, it pushes old actin layers outside : they are stretched and eventually break[14?].

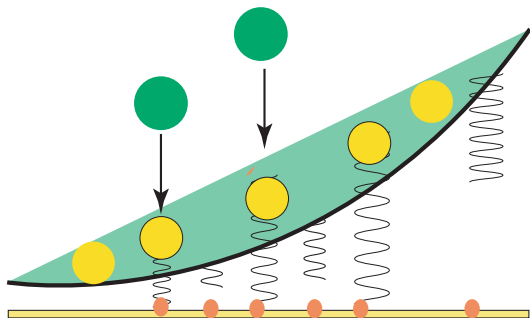
A

Gel grown around a bead



Key point : Integrin activation





Allosteric activation

Assume that a membrane protein can be in two states. It can be activated by direct ligand **binding**. This is the allosteric pathway (Changeux, Monod).

Example : number of bound receptors varies with the concentration of solute φ as

$$N_b = \frac{N_0}{1 + K_0^{-1} \exp[-A\varphi/k_B T]} \text{ with } A > 0 \quad (14)$$

When $\varphi \rightarrow \infty$ the number of bound (ie active) proteins increases. The “specificity,” i.e., the strength, range, and localization of this binding, can vary widely.

Indirect allosteric activation

It can also be activated by a redistribution of lateral pressure within the bilayer. This is an indirect mechanism without direct binding.

In the later case the activation of the protein depends on a lot of things : thickness, order parameter profile, phase transition etc. Let $p(z)$ the lateral pressure coupled to the area $A(z)$ of a protein. The change in chemical potential (per molecule) due to lateral stress can be written as (A = area per polar head)

$$\mu/T = \mu_0/T + \ln c + \frac{1}{T} \int p(z)A(z) dz \quad (15)$$

from which it follows that the lateral stress can change the conformation from the unactivated to the activated state. [3]

Indirect activation mechanisms II

If we assume two states (active and inactive)

$$\begin{aligned}\mu_a/T &= \mu_{0,a}/T + \ln c_a + \frac{1}{T} \int p(z) A_a(z) dz \\ \mu_i/T &= \mu_{0,i}/T + \ln c_i + \frac{1}{T} \int p(z) A_i(z) dz\end{aligned}\tag{16}$$

At equilibrium $\mu_a = \mu_i$, so that

$$\Delta\mu_0 + \ln [c_a/c_i] + \frac{1}{T} \int p(z) \Delta A(z) dz = 0\tag{17}$$

Thus, the fraction of active proteins relative to the inactive one

$$\frac{c_a}{c_i} = Ke^{-\alpha}\tag{18}$$

with

$$\alpha = \frac{1}{T} \int p(z) \Delta A(z)\tag{19}$$

which can depend, for example, on the lipid composition of the membrane.

- [1] Corinne Albiges-Rizo, Olivier Destaing, Bertrand Fourcade, Emmanuelle Planus, and Marc R Block. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci*, 122(Pt 17):3037–49, Sep 2009. doi: 10.1242/jcs.052704.
- [2] Achim Besser and Samuel A Safran. Force-induced adsorption and anisotropic growth of focal adhesions. *Biophys J*, 90(10):3469–84, 2006. ISSN 0006-3495 (Print).
- [3] R. S. Cantor. The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chem Phys Lipids*, 101(1):45–56, 1999. URL <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=10810924>.
- [4] F. Chamaroux, S. Fache, F. Bruckert, and B. Fourcade. Kinetics of cell spreading. *Phys Rev Lett*, 94(15):158102–158102, Apr 2005. URL <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=15904192>.
- [5] Damien Cuvelier, Olivier Rossier, Patricia Bassereau, and Pierre Nassoy. Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur Biophys J*, 32(0175-7571 (Print)):342–54, 2003.
- [6] H. Delanoë-Ayari, P. Lenz, J. Brevier, M. Weidenhaupt, M. Vallade, D. Gulino, JF. Joanny, and D. Riveline. Periodic adhesive fingers between contacting cells. *Phys Rev Lett*, 93(10): 108102–108102, Sep 2004. URL <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=15447454>.
- [7] Hans-Gunther Dobereiner, Benjamin J Dubin-Thaler, Gregory Giannone, and Michael P Sheetz. Force sensing and generation in cell phases: analyses of complex functions. *J Appl Physiol*, 98(4):1542–6, 2005. ISSN 8750-7587 (Print).
- [8] H.G. Döberheiner, B. Dublin-Thaler, G. Giannone, H.S. Xenias, and M.P. Sheetz. Dynamic phase transition in cell spreading. *Phys. Rev. Lett.*, 93(108105(4)), 2004.

- [9] Gregory Giannone, Benjamin J Dubin-Thaler, Hans-Gunther Dobereiner, Nelly Kieffer, Anne R Bresnick, and Michael P Sheetz. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*, 116(0092-8674 (Print)):431–43, 2004.
- [10] Herve Guillou, Adeline Depraz-Depland, Emmanuelle Planus, Benoit Vianay, Jacques Chaussy, Alexei Grichine, Corinne Albiges-Rizo, and Marc R Block. Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream rac1 signaling. *Exp Cell Res*, 314(3):478–488, 2008 Feb 1. ISSN 0014-4827 (Print). doi: 10.1016/j.yexcr.2007.10.026.
- [11] A. Hategan, K. Sengupta, S. Kahn, E. Sackmann, and DE. Discher. Topographical pattern dynamics in passive adhesion of cell membranes. *Biophys J*, 87(5):3547–3560, Nov 2004.
- [12] D. Maugis. *Contact, Adhesion and Rupture of Elastic Solids*. Springer, 2000.
- [13] Alice Nicolas, Benjamin Geiger, and Samuel A. Safran. Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34):12520–12525, 2004. URL <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=15314229>.
- [14] V. Noireaux, R.M. Goldsteyn, E. Friderich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes. Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys. J.*, 78:1643–1654, 2000.
- [15] A. Pierres, P. Eymeric, E. Baloché, D. Touchard, A.-M. Benoliel, and P. Bongrand. Cell membrane alignment along adhesive surface: Contribution of active and passive cell processes. *Biophys. J.*, 84:2058–2070, 2003.
- [16] Alexandre Saez, Axel Buguin, Pascal Silberzan, and Benoit Ladoux. Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? *Biophys J*, 89(6):L52–4, Dec 2005. ISSN 0006-3495 (Print). doi: 10.1529/biophysj.105.071217.
- [17] Pierre Sens and Matthew S. Turner. Budded membrane microdomains as tension regulators. *Phys. Rev. E*, 73(3):031918, Mar 2006. doi: 10.1103/PhysRevE.73.031918.

- [18] M P Sheetz. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (1471-0072 (Print)):392–6, 2001.
- [19] Jerome Solon, Jacques Pecreaux, Philippe Girard, Marie-Claude Faure, Jacques Prost, and Patricia Bassereau. Negative tension induced by lipid uptake. *Phys Rev Lett*, 97(9):098103, 2006. ISSN 0031-9007 (Print).
- [20] M Thery, A Pepin, E Dressaire, Y Chen, and M Bornens. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, (0886-1544 (Print)), 2006.

