

Machines moléculaires,

Allumez vos feux de position !

Giovanni Cappello (Giovanni.Cappello@curie.fr)
Institut Curie, Laboratoire Physicochimie Curie, UMR 168 CNRS,
26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05

Comment définir la vie ?
Un enfant de dix ans répondrait sans hésitation : « Ça bouge ! » La réponse est erronée, car beaucoup d'objets inanimés se déplacent, tout comme certains êtres vivants bougent relativement peu... Néanmoins, la sensation que vie et mouvement sont très corrélés persiste dans l'intuition commune. Contraction musculaire, migration des cellules, mitose et transport intracellulaire ne sont que quelques exemples de ce biofourmillement. Quelle est l'origine de tout ce mouvement ?

À la base d'une grosse partie de l'activité mécanique des cellules, il y a une classe de protéines : les *moteurs moléculaires*. Mais à quoi ressemblent ces « moteurs » nanométriques ? Comment sont-ils faits et quel est le processus physico-chimique qui leur permet de produire du travail mécanique ? Et, finalement, quelles expériences ont permis de les étudier, les visualiser et les perturber pour en comprendre le fonctionnement ?

Qu'est-ce qu'un moteur moléculaire ?

Les protéines dites *moteurs* transforment l'énergie chimique en travail mécanique, qui sera utilisé, par exemple, pour se déplacer et transporter du matériel intracellulaire. Cette caractéristique leur a valu l'appellation de *moteurs*, par analogie avec les moteurs macroscopiques qui convertissent les différentes énergies (chimique, thermique, électrique...) en travail.

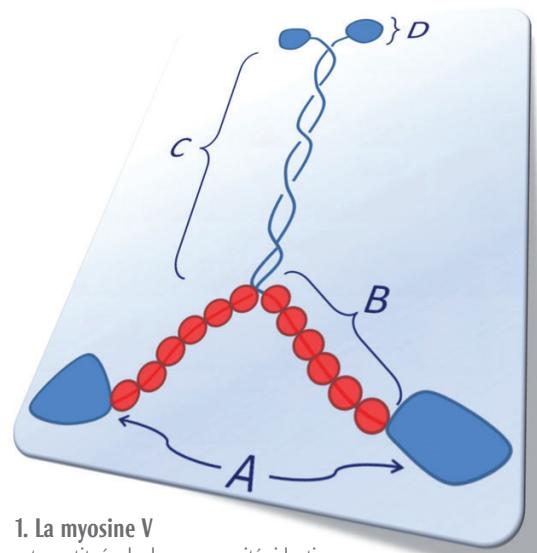
Dans la pratique, les moteurs moléculaires catalysent la réaction d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP), plus un phosphate libre (P_i) :



Cette réaction est exothermique et dégage une énergie d'environ 0,5 eV, vingt fois supérieure à l'énergie thermique des molécules environnantes, qui est transformée en travail mécanique.

Quelle est la structure d'un moteur moléculaire ?

Nous connaissons aujourd'hui plusieurs dizaines de protéines moteurs, toutes très différentes en apparence. On peut citer les dynéines et les kinésines qui se déplacent, comme sur des rails, le long des microtubules. Elles assurent ainsi le convoyage intracellulaire de protéines, acides nucléiques et organelles [1]. Les ADN et ARN polymérasées avancent activement le long de la *double hélice* pour copier ou transcrire l'ADN [2]. Un moteur très important pour la vie de la cellule est l'ATP synthase : cette machine moléculaire rotative est capable soit d'hydrolyser soit de synthétiser l'ATP, suivant son sens de rotation [3]. Et, finalement, des



1. La myosine V
est constituée de deux sous-unités identiques. Chaque sous-unité possède : une tête motrice (A), un bras de levier (B), une structure permettant la dimérisation (C) et une queue (D).

dizaines de myosines ont été répertoriées dans les dernières années [4].

C'est une myosine, la *myosine V*, que nous avons choisi de décortiquer pour illustrer comment fonctionnent les protéines moteurs. On laissera au lecteur curieux la recherche d'analogies et différences avec les autres machines moléculaires, dont les détails sont facilement accessibles sur le *web* (voir références).

Comparable à une locomotive, la myosine V convoie le matériel intracellulaire (vésicules, organelles, autres protéines...) en se déplaçant le long des filaments d'actine (voir encadré 1, p. 6). Ces filaments (en rouge) sont des longs polymères hélicoïdaux constitués de monomères structurellement asymétriques, qui confèrent une « directionnalité » à l'assemblage. Avec les microtubules, les filaments d'actine constituent le squelette de la cellule. Processivité et efficacité sont les caractéristiques qui font de la myosine V un transporteur redoutable. Une grande processivité signifie qu'elle parcourt des grandes distances (jusqu'à quelques micromètres), sans se détacher du filament d'actine et toujours dans la même direction : du bout « - » vers le bout « + » du filament, comme indiqué dans la figure de l'encadré. Haute efficacité est synonyme de parcimonie. Si, avec ses 12 cycles ATPase par seconde, il s'agit d'un moteur plutôt lent (certaines kinésines dépassent les 300 cycles par seconde), la myosine V utilise la quasi-totalité de l'énergie dégagée lors de l'hydrolyse de l'ATP (environ 8×10^{-20} joules).

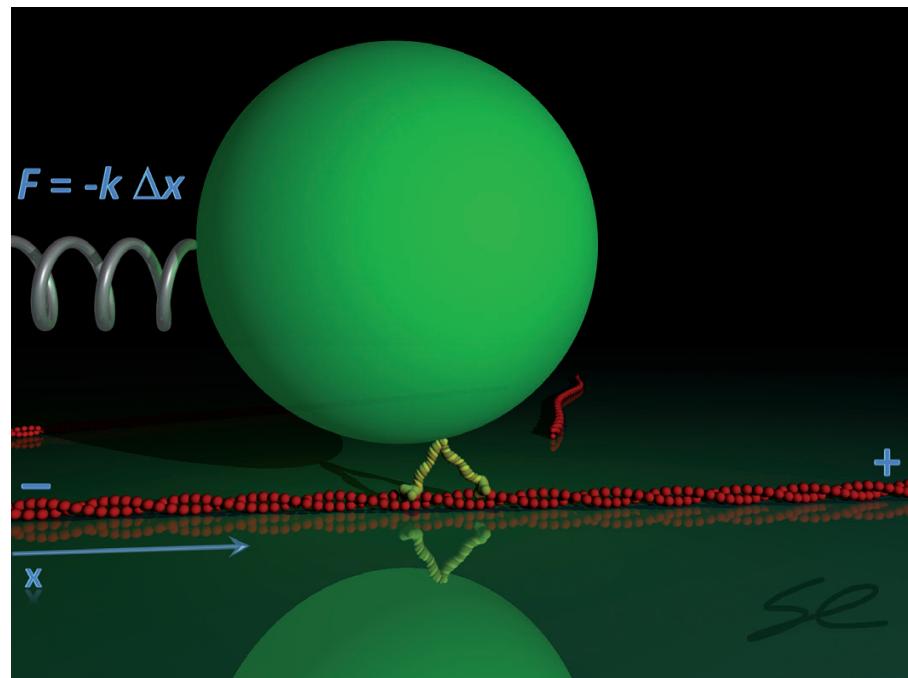
>>>

>>>

Du point de vue structural, la myosine V est un homodimère constitué de deux sous-unités parfaitement identiques (fig. 1). Ces deux parties sont produites à partir du même gène et, en solution, s'assemblent naturellement *via* une structure hélicoïdale entrelacée (domaine C). Chaque sous-unité comporte trois domaines :

- **La tête motrice (domaine A).** Son nom, *tête*, a des origines historiques et peut amener à confusion. Dans un souci d'anthropomorphisme, il serait mieux de l'appeler *main* ou *pied* de la myosine, car ce domaine s'accroche au filament d'actine et exerce une traction, de la même manière qu'une main tire sur une corde. La tête a deux fonctions : interagir avec l'actine, pour laquelle elle a une affinité spécifique, et hydrolyser l'ATP pour exercer une traction. Dans une myosine saine, ces deux fonctions sont parfaitement synchronisées.

- **Le bras (domaine B).** Il s'agit d'une longue structure, une sorte de levier qui amplifie le mouvement de la tête. Il faut noter qu'il s'agit d'une structure souple, qui est rigidifiée par la présence d'une troisième protéine : la calmoduline. Cette dernière module l'activité du moteur, en s'accrochant et se décrochant du bras de la myosine V suivant la concentration de calcium intracellulaire. À haute concentration de calcium, la calmoduline devient soluble



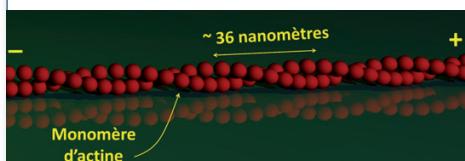
2. La myosine V (en jaune) se déplace le long d'un filament d'actine (en rouge) et tire un cargo artificiel, une microbille de polystyrène (verte). Les pinces optiques agissent comme un ressort, exercent une force sur la bille de polystyrène. De cette manière, elles opposent une force contrôlée à l'avancement du moteur.

et se détache du bras. Ce dernier perd son tonus, et la myosine devient inactive.

- **La queue (domaine D).** Sa fonction biologique est capitale, car, comme le crochet d'une locomotive, elle permet l'accrochage du cargo. Par contre, comme le domaine C, elle n'est pas impliquée dans le mouvement de la myosine V. Par simplicité, ces deux domaines seront négligés dans la suite.

Les filaments d'actine

encadré 1



L'actine est une protéine globulaire d'environ 5 nanomètres de taille. En présence d'ATP, l'actine polymérise et forme des filaments hélicoïdaux. Ces filaments ont plusieurs caractéristiques remarquables :

1. Leur longueur, pouvant atteindre plusieurs micromètres, est très grande comparée à leur diamètre (environ 10 nm). Malgré ce rapport d'aspect défavorable, ils restent très rigides.
2. En présence d'ATP, ils peuvent polymériser et dépolymériser sans arrêt, donnant lieu à des structures très dynamiques.
3. Les monomères d'actine ont une polarisation structurale naturelle qui confère une directionnalité au filament. Cette asymétrie, représentée dans la figure par les symboles « - » et « + », détermine la direction du mouvement des myosines.

Comment marche la myosine V ?

La simple description de sa structure ne suffit pas à comprendre comment la myosine fonctionne. Au cours de ces vingt-cinq dernières années, les scientifiques se sont évertués à observer le fonctionnement dynamique de ces machines. Tout d'abord, il fallait les visualiser ; malheureusement, si la microscopie électronique a une résolution suffisante pour imager des objets nanométriques, elle oblige à travailler sur des objets fixés, ce qui est trop contraignant pour observer un moteur, dont la principale fonction implique le mouvement. La ruse a été trouvée en 1983 par M. Sheetz et J. Spudich [5], qui ont attaché une bille microscopique (100 nm à 1 μm de diamètre) derrière le moteur, en profitant de sa capacité naturelle à lier des cargos (fig. 2).

Suffisamment grande pour être vue au microscope optique, la bille indique, instant par instant, la position du moteur. Cette idée simple, consistant pratiquement à mettre un « feu de position » à la protéine, a révolutionné le monde des moteurs moléculaires. On a pu enfin observer le mouvement d'une molécule unique et en

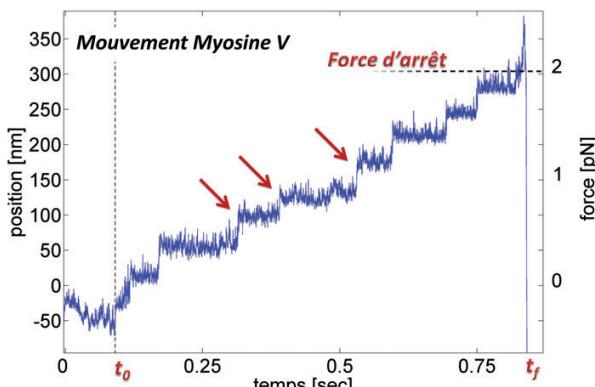
mesurer la vitesse, la processivité et bien d'autres paramètres, le tout sans passer par les mesures enzymatiques, beaucoup plus indirectes et issues de la moyenne d'un grand nombre d'événements.

Cette nouvelle approche expérimentale a été ensuite couplée à une puissante technique de micromanipulation : les pinces optiques. Ce dispositif est basé sur le principe qu'un faisceau laser très focalisé attire dans son foyer des petits objets, tels que des billes diélectriques. En 1990, S. Block [6] se servait pour la première fois des pinces optiques pour piéger une bille attachée au moteur moléculaire. Ceci a permis d'attraper le moteur, de le mettre doucement en contact avec le filament¹ et d'en suivre le mouvement.

Des expériences de suivi de particule unique, de plus en plus performantes, ont permis de caractériser différents moteurs (un exemple est donné dans l'encadré 2, p. 7). Le résultat, spectaculaire, est représenté dans la figure 3 : la courbe bleue représente la position en fonction du temps d'une bille attachée à une myosine V. Dans un premier temps l'agitation thermique fait fluctuer la bille dans le piège, puis, à l'instant t_0 , la myosine entre en contact avec le filament d'actine et commence à avancer. Tirée par la myosine, la bille s'échappe progressivement du piège. Cette courbe nous fournit deux caractéristiques du moteur : sa vitesse et son pas. Sa vitesse moyenne est d'environ 400 nm/s, ce qui correspond à un déplacement de plusieurs fois la taille du moteur, quelques dizaines de nanomètres, en une seconde.

3. La myosine V se déplace contre la force exercée par le piège optique, en faisant des pas de 36 nanomètres (indiqués ici par des flèches). La force maximale développée par cette myosine est de 2 pN, au-delà de laquelle le moteur se décroche de l'actine [7]. Ces expériences nécessitent une résolution nanométrique. Différentes techniques ont été mises au point pour atteindre de telles précisions.

Voir l'encadré 2 pour un exemple de détection subnanométrique.



Deuxièmement, on note que la bille présente un mouvement de type « sautoire » : la myosine V avance par pas rapides de 36 nanomètres, suivis par de longues pauses. Les 36 nanomètres correspondent exactement au pas de l'hélice du filament d'actine et nous indiquent que cette myosine se déplace d'un mouvement rectiligne ; les deux têtes sont toujours alignées avec le filament d'actine, comme nous l'avons représenté dans la figure 2. Après chaque saut, le moteur s'arrête pendant plusieurs dizaines de millisecondes : ce temps est nécessaire pour compléter le cycle chimique d'hydrolyse et charger une nouvelle molécule d'ATP.

Pour terminer, il ne faut pas oublier que dans son mouvement la bille s'échappe progressivement du piège optique, qui agit sur la bille tel un ressort (fig. 2). De fait, plus la bille s'éloigne du centre de la pince optique, plus la force de rappel augmente. La valeur de cette force, exprimée en picoNewton (10^{-12} N), est représentée sur l'échelle de droite de la figure 3, en fonction de la position du moteur. Malgré une force de rappel qui augmente pas après pas, la cadence du moteur reste constante... jusqu'à la *force d'arrêt* $F_{\max} = 2$ pN. Une fois cette force atteinte, à l'instant t_f le moteur préfère se détacher du filament qu'avancer plus loin. Cette valeur de 2 pN

peut être utilisée pour estimer le travail fourni par la myosine V, car à chaque cycle le moteur parcourt une distance $l = 36$ nm et développe une force maximale $F_{\max} = 2$ pN. Le travail W fourni est alors de l'ordre de $F_{\max} \times l = 72$ pN.nm ($7,2 \cdot 10^{-20}$ joules en S.I.). Cette valeur, minuscule dans un monde macroscopique, doit être comparée à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP : $\Delta G_{\text{ATP}} = 80$ pN.nm. Ceci signifie que la partie d'énergie chimique disponible qui est convertie en travail mécanique est égale au rapport $W/\Delta G_{\text{ATP}}$, soit 90%. Un tel rendement est bien supérieur à celui d'un moteur thermique macroscopique, qui en général est limité à environ 30%.

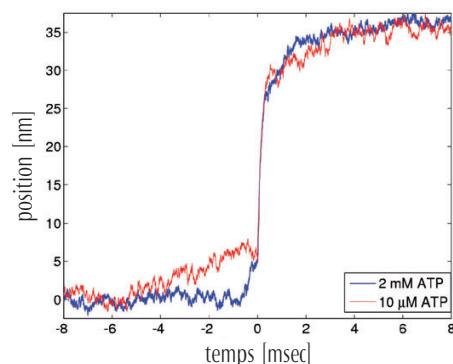
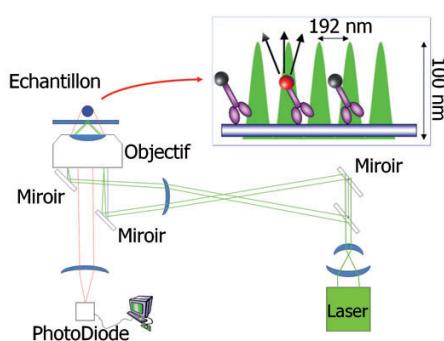
Alors, qu'est-ce qui permet au couple myosine/actine d'atteindre une telle efficacité, comparable uniquement à celle des meilleurs moteurs électriques ? Il s'agit d'une question toujours actuelle, dont les réponses sont probablement cachées dans les détails du fonctionnement de la myosine V. On se demande, par exemple, comment le cycle mécanique est lié au cycle chimique et quel rôle jouent les longues pauses entre un pas et le suivant. Quelques questions concernant le mouvement synchrone des deux têtes ont cependant trouvé une réponse récemment.

>>>

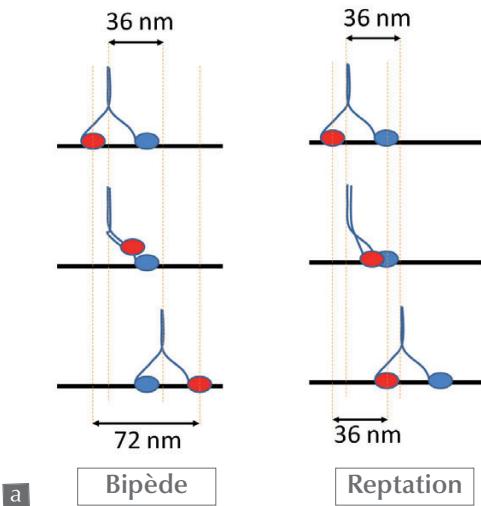
Un exemple de détection de molécule unique

encadré 2

Localiser une particule unique au nanomètre près a été un défi en soi, qui a stimulé l'ingéniosité des scientifiques. Dans ce but, nous avons mis au point une méthode interférométrique pour le suivi rapide d'une particule unique : l'éclairage d'un microscope optique a été remplacé par deux faisceaux lumineux, issus du même laser, qui se croisent au niveau de l'échantillon. Les deux faisceaux, cohérents entre eux, créent une figure d'interférence dans la zone d'observation, avec alternance de bandes éclairées et sombres. Une particule se déplaçant dans ce réseau de franges apparaît comme un point lumineux, qui clignote quand il traverse les zones éclairées. La lumière émise par la particule est récoltée par un détecteur ultrasensible, une photodiode à avalanche, et le signal traité numériquement. À partir de cette information, il est possible de remonter à la position de la particule avec une précision de 0,3 nm, et une résolution temporelle de quelques microsecondes.



À gauche, la réalisation du dispositif interférentiel : un faisceau laser est divisé en deux et focalisé sur le plan focal arrière d'un objectif de microscope. Ceci crée la figure d'interférence dans le plan d'observation au travers de laquelle se déplacent les moteurs. À droite : observation par interférométrie d'un pas d'une myosine V. La haute résolution spatiale et temporelle nous permet de distinguer les détails du pas. Le moteur avance d'abord de 5 nanomètres, puis il attend l'arrivée d'une molécule d'ATP pour compléter le pas. Les deux courbes ont été obtenues à deux concentrations d'ATP différentes : quand l'ATP est saturant (courbe bleue), le pas est complété rapidement ; si, par contre, la concentration d'ATP est limitante (courbe rouge), le moteur passe plus de temps dans cette phase intermédiaire.



4. Mouvement hand-over-hand de la myosine V. (a) Lorsque les deux têtes sont attachées au filament d'actine (images du haut), elles sont séparées de 36 nm, ce qui correspond au pas d'hélice du filament (encadré 1, p. 6). Deux mouvements sont possibles : un mouvement de bipède, où la tête avant (bleue) reste fixe, pendant que la tête arrière (rouge) se détache et se déplace vers l'avant de 72 nm (schémas de gauche) ; ou un mouvement de reptation, où toute la protéine se déplace parallèlement à elle-même, chaque tête avançant de 36 nm (schémas de droite). (b) Le marquage spécifique d'une seule tête de ce moteur par une petite bille d'or a permis de découvrir qu'elle marche comme un bipède.

>>>

Comment se déplacent les têtes de la myosine V pour produire un mouvement processif et efficace ?

Est-ce que la myosine V bouge parallèlement à elle-même, comme un ver de terre qui rampe le long du filament d'actine ou avance-t-elle comme un bipède qui alterne les deux têtes (qu'il faudrait, cette fois-ci, appeler pieds) ?

La réponse a été fournie par P. Selvin [8] et confirmée par A. Dunn [9], avec une expérience simple et astucieuse. L'idée est d'observer le déplacement d'une seule des deux têtes plutôt que le mouvement global du moteur. En effet, si le moteur avançait comme un ver, les deux têtes glisseraient à chaque pas de 36 nanomètres (fig. 4a droite). Dans le cas d'un bipède, en revanche, une tête resterait immobile pendant que l'autre avancerait de 72 nanomètres (fig. 4a gauche). Pour visualiser la position de la tête de la myosine V en temps réel, A. Dunn et ses collaborateurs ont modifié, par voie génétique, une *calmoduline* proche de la tête de la myosine ; ceci dans le but de la conjuguer à une petite particule d'or (fig. 4b). L'or diffuse très bien la lumière et il est optiquement visible en très petite quantité. Une sphère de 40 nanomètres de diamètre, par exemple, peut être suivie avec un microscope optique standard. En même temps, sa taille étant comparable à celle de la protéine, elle en perturbe peu le mouvement. La bille a été filmée à l'aide d'une caméra ultrarapide à plus de 1000 images par seconde et ensuite sa position a été mesurée avec une précision nanométrique.

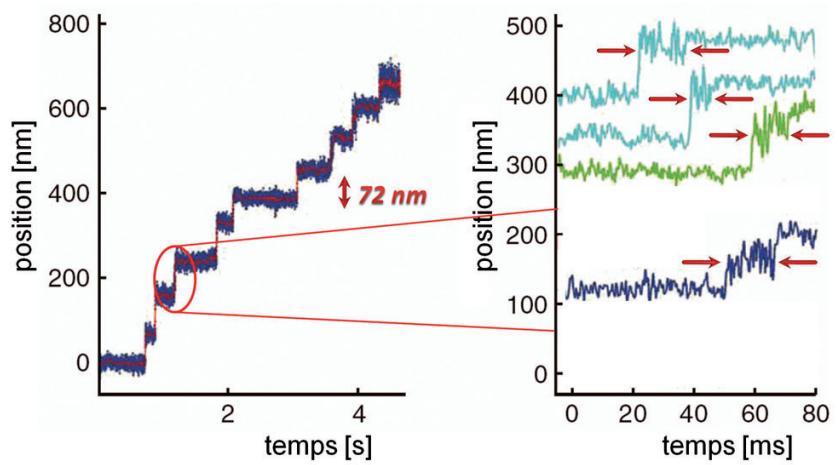
La figure 5 montre une suite de pas, dont la hauteur moyenne est de 72 nanomètres environ. Aucun pas de 36 nanomètres n'a été détecté. De plus, quand on s'intéresse à ce qui se passe pendant le pas (on voit les détails de plusieurs pas dans les courbes à droite), on s'aperçoit que le mouvement se fait en deux temps. La tête de la myosine se déplace d'abord de 50 nm, puis elle s'accorde une courte pause avant de se rattacher au filament d'actine. Pendant cette pause, indiquée dans la figure 5 par des flèches rouges, la bille d'or fluctue plus que d'habitude. L'augmentation des fluctuations dans cette partie de la courbe semble indiquer que la myosine V se trouve dans la position schématisée dans la figure 4b :

la tête en l'air à la recherche du prochain site d'accrochage.

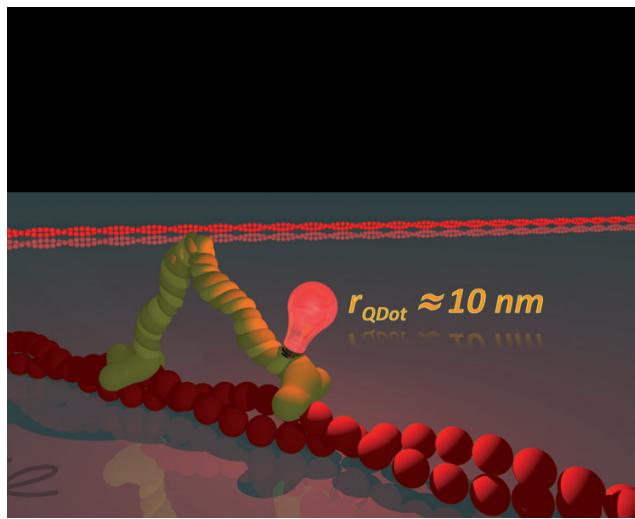
Conclusion : la myosine V se déplace comme un bipède.

De retour dans la cellule

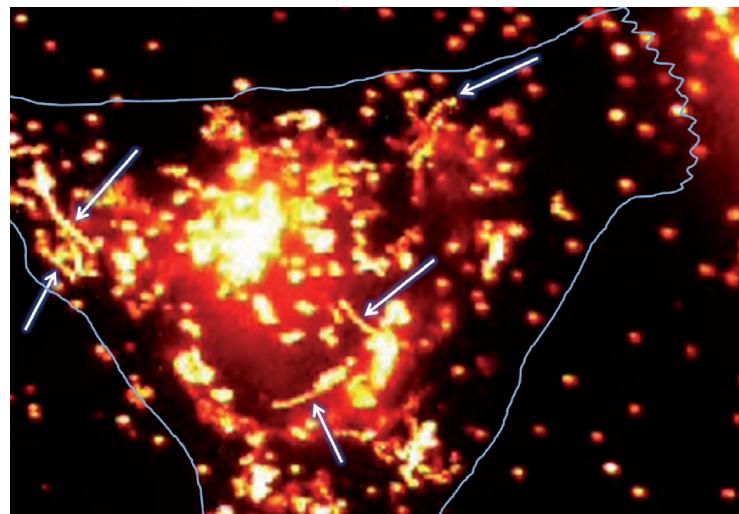
Nous avons vu comment soutirer quelques petits secrets à la nature, grâce à la visualisation d'une protéine unique. Toutefois, nous pouvons rester critiques par rapport à nos expériences et nous demander quelle est leur pertinence biologique. De fait, nous n'avons décrit jusqu'ici que des systèmes minimaux, reconstitués *in vitro* à partir de myosines, filaments d'actine et ATP, et qui restent



5. Mouvement de la bille d'or attachée à la tête de la myosine V : position en fonction du temps. À gauche, on distingue les pas de 72 nm. À droite, quelques agrandissements de la trace, qui mettent en évidence le détail des pas et montrent qu'ils se font en deux temps [9].



6. Marquage d'une molécule unique à l'aide d'un *quantum dot* semi-conducteur.



7. Les flèches indiquent les traces laissées par des myosines V se déplaçant à l'intérieur d'une cellule en culture.

très loin de l'environnement naturel de ces moteurs : la cellule. Est-ce que ces résultats sont représentatifs de ce qui se passe réellement dans le cytoplasme, où le fonctionnement de la myosine peut être affecté par le pH, la force ionique ou par la présence de partenaires et cofacteurs ? La solution naturelle consiste à effectuer toutes les expériences à l'intérieur de la cellule. Cependant, cette voie a pu être empruntée uniquement quand on a su rendre les moteurs visibles dans une cellule. Encore une fois, il fallait identifier une sonde non toxique, suffisamment petite pour ne pas perturber la myosine, assez stable et lumineuse pour être détectée et, finalement, facilement reconnaissable. Et trouver un moyen de l'attacher à la myosine [10]...

Les bonnes candidates étaient de nouvelles particules semi-conductrices, d'environ dix nanomètres de diamètre, les *quantum dots* (QDs) ou plots quantiques. Ces nanoparticules sont beaucoup plus petites que les billes de polystyrène (1 µm environ) et perturbent moins le mouvement de la myosine dans un environnement aussi encombré que la cellule.

De plus, les QDs sont fluorescents : comme de l'encre sympathique ils apparaissent rouges quand ils sont éclairés avec de la lumière ultraviolette², ce qui les rend facilement reconnaissables dans la cellule. Une fois pourvus d'un revêtement non toxique pour la cellule et conjugués à la myosine par la technique mise au point pour les billes d'or, les *quantum dots* sont finalement injectés dans une cellule vivante et leurs mouvements filmés.

Le *quantum dot*, que nous avons schématisé par une ampoule dans la figure 6, est sensiblement plus petit que les billes d'or (les rapports des tailles entre les sondes ont été préservés dans nos

images). De plus, il est facilement reconnaissable par sa couleur rouge ! On peut voir cela très bien dans la figure 7, où l'on voit les *quantum dots*/myosine à l'intérieur d'une cellule en culture. Le contour de la cellule est mis en évidence par la ligne bleue, et à chaque point brillant correspond un QD. Avec un temps d'exposition suffisamment long (quelques secondes) on crée un effet de persistance, qui permet d'identifier les objets en mouvement : de fait, les particules laissent des *traînées* lorsqu'elles se déplacent, indiquées par les flèches blanches dans l'image.

À partir de ce type d'expérience, on mesure déjà la vitesse et la processivité du moteur dans la cellule. On espère qu'on pourra bientôt accéder à d'autres paramètres dynamiques du moteur, tels que la taille de son pas et les forces qu'il exerce. Mais, surtout, ces premières expériences dans les cellules confirment la validité des observations *in vitro* et ouvrent une nouvelle voie d'accès aux mystères des machines moléculaires.

Conclusion

Nous avons décrit ici quelques-unes des expériences les plus élégantes qui ont dissipé le brouillard autour de l'activité des myosines V, avec une attention particulière pour les astuces qui ont rendu possible la visualisation dynamique de ces machines nanométriques. Pourtant, le défi ne s'arrête pas ici. Biologistes et physiciens souhaitent, d'une part, comprendre le comportement du moteur dans la cellule, où il n'est qu'un élément d'une machine bien complexe. D'autre part, ils rêvent de pouvoir s'inspirer de ces machines pour réaliser des nanomoteurs artificiels. ■

Références

- 1 • www.proweb.org/kinesin/
- 2 • http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_polymerase
- 3 • www.k2.phys.waseda.ac.jp/Movies.html
- 4 • www.bms.ed.ac.uk/research/others/smacier/myosins.htm
- 5 • A.J. Spudich, S.J. Kron, M.P. Sheetz, "Movement of myosin-coated beads on oriented filaments reconstituted from purified actin", *Nature* **303** (1983) 31-35.
- 6 • S.M. Block, L.S. Goldstein, B.J. Schnapp, "Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers", *Nature* **348** (1990) 348-52.
- 7 • G. Cappello *et al.*, "Myosin V stepping mechanism", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 15328-33.
- 8 • A. Yildiz *et al.*, "Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization", *Science* **300** (2003) 2061-5.
- 9 • A.R. Dunn, J.A. Spudich, "Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation", *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (2007) 246-8.
- 10 • S. Courty *et al.*, "Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging", *Nano lett.* **6** (2006) 1491-5.

1- L'expérience originale a été faite sur le système kinésine – microtubule. Elle a été ensuite reproduite avec une grande quantité de moteurs différents, parmi lesquels le couple myosine V – actine.

2- Les *quantum dots* peuvent être excités dans tout le spectre de l'UV au visible, et peuvent réémettre dans différentes couleurs du visible en fonction de leur taille.